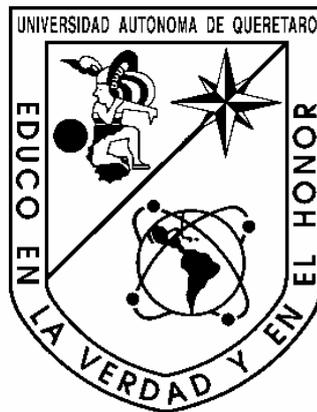


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)**

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**“DIVERSIDAD GENÉTICA Y CAPACIDAD PARA FORMAR
BIOPELÍCULAS DE CEPAS DE *Leuconostoc* spp. AISLADAS
DE UNA PLANTA PROCESADORA DE SALCHICHAS”**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
QFB. J. JESÚS PADILLA FRAUSTO**

**DIRIGIDO POR
DRA. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO**

Santiago de Querétaro, Qro., Noviembre del 2010



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA
PROPAC

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“DIVERSIDAD GENÉTICA Y CAPACIDAD PARA FORMAR BIOPELÍCULAS DE CEPAS DE *Leuconostoc* spp. AISLADAS DE UNA PLANTA PROCESADORA DE SALCHICHAS”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta

QFB. J. Jesús Padilla Frausto

Dirigido por

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

SINODALES

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Presidente

Dr. Eduardo Fernández Escartín

Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Vocal

Dr. Luis Miguel Salgado Rodríguez

Suplente

Dra. Eva María Santos López

Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Directora de la Facultad de Química

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
**Director de Investigación y
Posgrado**

Ciudad Universitaria
Santiago de Querétaro, Qro. México
Noviembre del 2010

RESUMEN

Leuconostoc spp. en salchichas empacadas al vacío puede generar deterioro prematuro del producto. Su capacidad para formar biopelículas en los equipos de producción dificulta el control mediante germicidas y propicia la persistencia de reservorios. El objetivo de este trabajo es evidenciar la diversidad genética y la capacidad de adhesión, colonización y formación de biopelículas de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de una empresa productora de salchicha a lo largo de tres años. Se emplearon 87 cepas de *Leuconostoc* de las especies *mesenteroides*(39), *fallax*(29), *lactis*(15), *plantarum*(3) y *citreum*(1). Se utilizaron RAPD y PFGE para medir la diversidad genética. Se estudió la capacidad de adhesión y colonización en esferas de acero inoxidable (AI) y polipropileno (PP). Las cinéticas de colonización se modelaron matemáticamente y se verificó la formación de biopelículas mediante microscopía electrónica de barrido. Se evaluó la susceptibilidad a germicidas químicos de las cepas de *Leuconostoc* spp. formando biopelículas. Finalmente, se exploró la asociación de las características fenotípicas de las cepas con su genotipo. *Lc. mesenteroides* mostró el mayor número de genotipos(37) con respecto a *Lc. fallax*(23), *Lc. lactis*(6), *Lc. plantarum*(2) y *Lc. citreum*(1). Algunos genotipos de *Lc. lactis* y *Lc. mesenteroides* muestran persistencia hasta por dos años en la línea de producción. En general, las cepas muestran mayor capacidad para adherirse sobre PP (0.1-11.9%) que en AI (0.0-1.8%). Dentro de cada especie, existe una relación directa entre porcentaje de adhesión y número de bandas en el patrón genético por RAPD. *Lc. mesenteroides* colonizó con mayor rapidez ambos materiales (≤ 0.89 Log/h), en contraste con *Lc. fallax* (≤ 0.43 Log/h) y *Lc. lactis* (≤ 0.19 Log/h). El efecto germicida total sobre las cepas fue: agua electrolizada neutra [AEN] (3.5-3.8 Log) > cloro (1.6-2.7 Log) > ácido peroxiacético (1.4-2.3 Log) > sales cuaternarias (-0.02-0.34 Log). La variabilidad en la reducción por AEN entre cepas de cada especie fue *Lc. lactis* > *Lc. fallax* \approx *Lc. mesenteroides*. AEN redujo 6.7, 5.4, 4.5, 2.8 LogUFC de *Lc. lactis* depositado, adherido, y después de 4 y 8 días de colonización en PP, respectivamente. En AI las cifras correspondientes fueron 5.4, 3.8, 3.6, 2.8 LogUFC. Nuestros resultados demuestran la existencia de reservorios de *Leuconostoc* en el equipo de producción. Las cepas de *Leuconostoc* spp. mostraron capacidad para adherirse y colonizar AI y PP teniendo únicamente como nutrientes sólidos de salchicha. Estos microorganismos podrían generar biopelículas en los equipos de producción. La mayor reducción de *Leuconostoc* spp. en biopelícula se logró con AEN, pero su eficiencia se va mermando a medida que la biopelícula madura.

(Palabras claves: *Leuconostoc*, RAPD, PFGE, diversidad genética, biopelículas, germicidas, agua electrolizada neutra).

ABSTRACT

Leuconostoc spp. in vacuum packed sausages can cause its premature spoilage. *Leuconostoc*'s ability to form biofilms on production equipment surfaces difficult its control via sanitizers and it enhances its persistence. The aim of this study was to study genetic diversity, attachment, colonization and biofilm formation of *Leuconostoc* spp. strains isolated from a sausage processing environment along three years. Eighty seven strains of *Leuconostoc* were used: *Lc. mesenteroides*(43), *Lc. fallax*(29), *Lc. lactis*(15), *Lc. plantarum*(3) and *Lc. citreum*(1). RAPD and PFGE were used to measure genetic diversity. We studied the attachment and colonization of *Leuconostoc* strains to stainless steel balls(SSB) and polypropylene balls(PPB). The colonization kinetics were mathematically modeled and the biofilms formation was verified by scanning electron microscopy. The susceptibility of *Leuconostoc* biofilms to sanitizing agents was examined. Finally, the association of phenotypic and genotypic characteristics of *Leuconostoc* strains was explored. *Lc. mesenteroides* shows the highest number of genotypes(41) compared with *Lc. fallax*(23), *Lc. lactis*(6) and *Lc. plantarum*(2). Some genotypes of *Lc. lactis* and *Lc. mesenteroides* persisted for up to two years in the processing environment. In general, the strains show greater ability to attach to PPB (0.1-11.9%) than to SSB (0.0-1.8%). Within each specie, there is a direct relationship of attachment proportion and the number of bands in the RAPD genetic pattern. *Lc. mesenteroides* colonized both materials (≤ 0.89 Log/h) faster to *Lc. fallax*(≤ 0.43 Log/h) and *Lc. lactis*(≤ 0.19 Log/h). The overall germicide effect on strains was: neutral electrolyzed water [NEW] (3.5-3.8 LogCFU) > chlorine (1.6-2.7 LogCFU) > peracetic acid (1.4-2.3 LogCFU) > quaternary salt compounds (-0.02-0.34 LogCFU). Among strains for each specie, the variability in the log reduction by NEW was: *Lc. lactis* > *Lc. fallax* \approx *Lc. mesenteroides*. NEW decreased the viability of *Lc. lactis* deposited, attached, and after 4 and 8 days of colonization in PPB in 6.7, 5.4, 4.5, 2.8 LogCFU, respectively. In SSB, the corresponding figures were 5.4, 3.8, 3.6, 2.8 LogCFU. Our results demonstrated the occurrence of *Leuconostoc* reservoirs in sausage production facilities. Strains of *Leuconostoc* spp. show capacity to attach and to colonize SSB and PPB surfaces with sausage solids as substrate. These microorganisms may form biofilms in sausage production equipment. *Leuconostoc* biofilm showed the greatest viability reduction by NEW, but it was decreased as the biofilm was matured.

(Key words: *Leuconostoc*, RAPD, PFGE, genetic diversity, biofilms, sanitizer, neutral electrolyzed water).

DEDICATORIA

A mis papás: Estela y Ramiro, por que siempre tenían una palabra de aliento y apoyo cuando más lo necesite.

A mis hermanos y demás familiares, por enseñarme con su ejemplo las debilidades de ser humano.

*A Nancy Jaqueline, que siempre me brindó la motivación y el comentario adecuado para no desistir, por sufrir conmigo mis penas y festejar conmigo los logros.
Te amo.*

AGRADECIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Gracias por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría.

Universidad Autónoma de Querétaro

Gracias por abrir las puertas de sus instalaciones, para que lograra esta meta.

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Gracias, por ser mucho más que un simple facilitador, por su confianza depositada en mí, por darme tanta flexibilidad, por permitirme equivocarme y experimentar. Por su sabios consejos, su amistad y su envidiable serenidad.

Porque formar y educar no es llenar un hueco, sino encender un fuego.
(Baudelaire).

Usted lo logró.

Dra. Motserrat y M en C. Beatriz

Gracias por su apoyo moral y compartir conmigo un poco de lo mucho que saben. Por su compañerismo y amistad.

Dr. Eduardo. F. Escartin, Dr. Luis Miguel Salgado y Dra. Eva M. Santos

Gracias por permitir que me quede con un poco de su vasta experiencia y por su asesoría en la realización de este proyecto.

Biol. Araceli Azabache, Dr. Marcelo Silva Universidad Autónoma de Aguascalientes

Gracias por compartir sus conocimientos y el apoyo en los estudios de microscopía electrónica de barrido

Maestros del DIPA y personal administrativo

Gracias por proporcionarme las armas científicas para realizar mi tesis y facilitar amablemente los trámites.

A mis amigos: Sra. Martha, Dulce, Rocio, Berenice, Viridiana, Vanesa, Tess, Laura, Ana Laura, Alma, Fatima, Estefanía, Aurea, Gaby, Itsi, Erika, Marcelo, Betty, Fanny, Fer-Ivan, Hector Pool, Alfonso, Ivan, Irais, Consuelo, Eli, Dulce, Leova, Yuli, Esau, Vero, Fer, Fer, Brenda, Josué y Montse, entre otros muchos más, compañeros del laboratorio y del PROPAC.

Gracias por su compañerismo y alentarme a seguir a pesar de tantos obstáculos.

Alma, Carmen y Omar: Gracias por su amistad y porque sin su ayuda no habría podido lograr todo lo que se realizó en esta investigación.

Hector y Martha

Gracias por ser mis hermanos, soportarme y darme su incondicional y constante apoyo, por fungir como mi familia cuando lo necesite y por sus consejos tan atinados.

Dios

Gracias por que me ha permitido llegar y concluir esta meta en mi vida, por brindarme esperanza, fuerza, luz y paciencia en todo momento.

A los que ya han leído este documento y a los que lo leerán, Gracias por interesarse en mi trabajo, espero les sea útil.

La falta de ideas es la peor de las carencias.
(E. Rojas)

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Productos cárnicos. Generalidades.....	3
2.2. Producción industrial y consumo de salchicha	3
2.3. Microbiología y deterioro la salchicha.....	6
2.3.1. <i>Leuconostoc</i> spp. como potencial deteriorador	7
2.3.2. Impacto económico del deterioro de la salchicha	9
2.4. Prevención y control de deterioro de la salchicha, durante su comercialización	10
2.4.1. Control de microorganismos instalados en equipos y utensilios en la industria alimenticia mediante desinfección.....	10
2.4.1.1. Formación de biopelículas en superficies del equipo de producción.....	12
2.4.1.2. Resistencia de los microorganismos a la acción de germicidas.....	13
2.4.1.3. Biodiversidad de los microorganismos y su implicación para la industria alimenticia	16
2.5. Identificación de fuentes y reservorios de contaminación por <i>Leuconostoc</i> spp. en una planta productora de salchichas.....	17
2.5.1. Tipificación bacteriana (principios).....	20
2.6. Compromiso de la industria alimenticia, con el consumidor, sobre calidad e inocuidad de los productos listos para su consumo.	28
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS.....	32
6. METODOLOGÍA	33
6.1. Materiales	33
6.2. Métodos.....	37
6.2.1. Procedimientos generales	37
6.2.2. Tipificar mediante RAPD y PFGE las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. aisladas de materiales y superficies de una planta procesadora de salchicha.....	37

6.2.3.	Determinar la capacidad de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. para adherirse, colonizar y formar biopelículas en superficies de polipropileno y acero inoxidable.....	40
6.2.4.	Investigar la asociación del genotipo con la capacidad de adhesión y los parámetros cinéticos de colonización de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp.	43
6.2.5.	Evaluar la susceptibilidad de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. con capacidad de formar biopelículas, a la acción de germicidas químicos.....	44
6.2.5.1.	Efecto de los germicidas sobre biopelículas de <i>Leuconostoc</i> spp. en acero inoxidable y polipropileno.	44
6.2.2.1.	Efecto del AEN, sobre los genotipos críticos de <i>Leuconostoc</i> spp.....	45
6.2.2.2.	Efecto de la etapa de formación de la biopelícula de <i>Leuconostoc</i> sobre la eficiencia de AEN.....	45
7.	RESULTADOS Y DISCUSION	47
7.1.	Diversidad genética de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. aisladas de una empresa productora de salchichas	47
7.1.1.	Reservorios y rutas de contaminación por <i>Leuconostoc</i> spp. en la planta procesadora de salchicha.....	53
7.2.	Capacidad de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. aisladas de una empresa productora de salchichas para adherirse y formar biopelículas en superficies de acero inoxidable y polipropileno.....	57
7.2.1.	Adhesión <i>Leuconostoc</i> spp. a superficies de acero inoxidable y polipropileno, y su asociación con el genotipo.....	58
7.2.2.	Colonización de superficies de acero inoxidable y polipropileno por <i>Leuconostoc</i> spp., y su asociación con el genotipo.....	65
7.2.3.	Confirmación de la formación de biopelículas mediante métodos ópticos.	73
7.3.	Asociación del genotipo con la capacidad de adhesión y los parámetros cinéticos de colonización de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp.	80
7.4.	Susceptibilidad de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. con capacidad de formar biopelículas, a la acción de germicidas químicos.	
8.	CONCLUSIONES.....	100
9.	REFERENCIAS CITADAS.....	102

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Especies de <i>Leuconostoc</i> .	8
2	Fuente y fecha de aislamiento de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. aisladas de una empresa productora de salchichas, empleadas en este estudio.	35
3	Iniciador aleatorio y condiciones de amplificación.	39
4	Tratamientos germicidas y su tiempo de exposición.	44
5	Definición de las etapas de la biopelícula.	45
6	Comparación entre los porcentajes de asociación genética (Dice) obtenida mediante la técnica de RAPD y PFGE para cada genotipo.	54
7	Genotipos de interés encontrados en las cepas de <i>Lc. mesenteroides</i> .	54
8	Genotipos de interés encontrados en las cepas de <i>Lc. fallax</i> .	54
9	Genotipos de interés encontrados en las cepas de <i>Lc. lactis</i> .	55
10	Ventajas y desventajas del modelo de placas y el de esferas.	60
11	Características fenotípicas de interés de las cepas que fueron empleadas para evidenciar la formación de biopelículas según especie.	74
12	Diversidad de respuestas en las reducciones (LogUFC/cm ²) por la acción del AEN, según material de soporte y especie de <i>Leuconostoc</i> .	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Producción de embutidos en México (1994-2007).	4
2	Línea de producción de salchichas e incidencia de <i>Leuconostoc</i> en el equipo.	19
3	Diagrama general de promoción de la adhesión y colonización de <i>Leuconostoc</i> en esferas de polipropileno y acero inoxidable.	41
4	Perfiles genéticos por especie.	47
5	Perfiles genéticos según especie de <i>Leuconostoc</i> spp.	48
6	Dendrograma de RAPD para la relación genética de las cepas de <i>Leuconostoc</i> , según especie.	50
7	Desarrollo de <i>Leuconostoc</i> spp. en suspensión de salchicha, según concentración.	59
8	Porcentaje de adhesión de <i>Leuconostoc</i> spp. en suspensión de salchicha, a superficies de polipropileno.	59
9	Permanencia de células adheridas y no a las esferas después de varios lavados con SSF estéril.	60
10	Adhesión de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. según material de contacto.	61
11	Adhesión de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. según año de aislamiento y material de contacto.	62
12	Adhesión de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. según fuente de aislamiento y material de contacto.	63
13	Adhesión de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. según fuente de aislamiento y material de contacto.	64
14	Correlación de los valores de Duración de fase Lag (h) obtenidos por ambas ecuaciones.	67
15	Correlación de los valores de velocidad máxima alcanzada ($\text{LogUFC}/\text{h}/\text{cm}^2$) obtenidos por ambas ecuaciones.	67
16	Correlación de los valores de población máxima alcanzada ($\text{LogUFC}/\text{cm}^2$) obtenidos por ambas ecuaciones.	67
17	Análisis de residuales de cada ecuación (Baranyi vs Gompertz) y prueba de Tukey-Kramer, según especie.	67
18	Ejemplos de cinéticas de colonización observadas para cada especie de <i>Leuconostoc</i> , según material de superficie de contacto.	68
19	Tiempo en que las cepas de <i>Leuconostoc</i> comienzan la colonización (Lag) de acero inoxidable (AI) y polipropileno (PP), según especie.	70
20	Velocidad máxima alcanzada por las cepas de <i>Leuconostoc</i> en colonización de acero inoxidable (AI) y polipropileno (PP), según especie.	70
21	Población máxima alcanzada por las cepas de <i>Leuconostoc</i> en colonización de acero inoxidable (AI) y polipropileno (PP), según especie.	70
22	Relación entre adhesión y los parámetros de colonización observadas para cada especie de <i>Leuconostoc</i> , según material de superficie de contacto.	72
23	Micrográficas electrónicas de barrido de aglomerados celulares y biopelículas de <i>Leuconostoc</i> spp. sobre polipropileno y acero inoxidable, después de 72h de almacenamiento a 30°C en suspensión de salchicha 1% p/v.	75
24	Proceso de formación de una biopelícula de <i>Lc. lactis</i> sobre acero inoxidable y polipropileno, después de un almacenamiento a 30°C en	78

	suspensión de salchicha 1% p/v.	
25	Tamaño y espesor de las biopelículas de <i>Leuconostoc</i> spp. sobre polipropileno, después de 72h de almacenamiento a 30°C en suspensión de salchicha 1% p/v.	79
26	Correlación del porcentaje de adhesión contra el número de bandas presentes en el perfil genético (RAPD) de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. según material de superficie de contacto.	81
27	Asociación entre el genotipo y los parámetros cinéticos de <i>Leuconostoc</i> al colonizar AI y PP, según especie.	83
28	Efecto de los germicidas sobre células de <i>Leuconostoc</i> inmersas en una biopelícula (72h), según especie.	88
29	Efecto del AEN sobre células inmersas en biopelículas, de los genotipos de <i>Leuconostoc</i> con características críticas.	92
30	Efecto del AEN sobre células inmersas en biopelículas, de los genotipos de <i>Leuconostoc</i> con características críticas.	93
31	Relación entre el efecto del AEN sobre células de <i>Leuconostoc</i> inmersas en biopelículas en ambos materiales.	94
32	Efecto del AEN sobre células <i>Leuconostoc lactis</i> (genotipo III) según etapas de formación de la biopelículas.	96

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Aw	Actividad de agua (valor de 0-1)
Abs ₂₆₀	Absorbancia a 260nm, leídos en espectrofotómetro de luz ultravioleta
AEN	Agua Electrolizada Neutra
ANTAD	Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales, México
APA	Ácido Peroxiacético
BPSO	Buenas Prácticas Sanitarias de Operación
CFSAN	Centro de seguridad alimenticia y nutrición aplicada, EUA
DNA	Ácido Desoxi-Ribonucleico
DP	Diluyente de peptona (1g/L)
DO	Densidad Óptica
PFGE	Electroforesis en Gel por Campos Pulsados
Eh	Potencia de óxido reducción
ETA's	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
EUA	Estados Unidos de America
FAO	Organización de Alimentos y Medicamentos, EUA
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos, EUA
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
HR	Humedad relativa (en porcentaje, valor de 0-100)
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México
Kb	Kilobases
NMX	Norma Mexicana
NOM	Norma Oficial Mexicana
MEB	Microscopía electronica de barrido
p/v	Relación peso-volumen
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno (valor de 0-14)
ppm	Partes por millon (mg/L, mg/Kg ó µL/L)
PROFECO	Procuraduría Federal del Consumidor, México
RAPD	Amplificación Polimorfica Aleatorizada de ADN
rpm	Revoluciones por minuto
QS	Persepcion en quorum (por sus siglas en ingles)
SCFI	Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, México
SPE	Sustancias Polimericas Extracelulares
SSA	Secretaria de Salud, México
SSF	Solución Salina Fisiologica
UFC	Unidad Formadora de Colonias
v/v	Relación volumen-volumen
WHO	Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos cocidos no son productos estériles, sin embargo, es posible elaborarlos con un mínimo de carga microbiana hasta su empaque, y limitar el desarrollo de estos empleando la refrigeración durante la comercialización.

En la salchicha empacada al vacío la forma más común de deterioro microbiano consiste en la generación de material lechoso y gasificación, generalmente debido a la actividad de bacterias ácido lácticas, en particular del género *Leuconostoc*.

Un estudio previo detectó posibles fuentes de contaminación de *Leuconostoc* a salchicha tipo Viena en una planta procesadora. Evidenció tres aspectos de interés: 1) el tratamiento térmico de cocción, disminuye la carga microbiana de la emulsión cárnica cruda, sin embargo, no elimina a totalidad la flora, ya que se detectaron sobrevivientes de *Leuconostoc* a este proceso; 2) la detección de *Leuconostoc* mediante PCR, demostró que está distribuido dentro de la planta a lo largo de todo el proceso de elaboración de la salchicha; 3) la incidencia de *Leuconostoc* en el equipo de la línea de producción de salchicha fue de 28% (n=144), lo que sugiere una importante participación en el ingreso del deteriorador al producto. Adicionalmente, se observó que las cepas de *Lc. mesenteroides* produjeron un patrón de deterioro compatible con el que se presentó en salchicha empacada en comercialización. Las cepas de *Lc. lactis*, presentaron mayor potencial deteriorador, pero con patrón distinto al observado en los brotes de deterioro que irrumpieron en una planta productora, en años anteriores.

Un producto correctamente procesado, tiene una vida de anaquel de hasta 90 días, pero esta se reduce notablemente a tres o cuatro semanas, bajo condiciones adversas. Las pérdidas económicas en las industrias productoras de salchicha, por deterioro de producto podrían ser cuantiosas. Lo cual no sólo afecta la economía de la empresa, sino que puede generar una restricción del abastecimiento producto en el mercado y disminución del prestigio de la marca.

La prevención del deterioro requiere de acciones encaminadas a reducir o eliminar los microorganismos deterioradores en las instalaciones de la empresa y por consiguiente en el producto en proceso, así como evitar su contaminación ulterior al tratamiento térmico de cocción. Un programa efectivo de sanidad ofrece una larga vida de anaquel e inocuidad del producto. El control de estos microorganismos,

incluye la prevención de la contaminación mediante la introducción de buenas prácticas sanitarias durante su producción y comercialización, así como la utilización de tratamientos químicos, tanto en la formulación del producto, como para aplicación directa sobre las superficies de contacto del equipo. Sin embargo, la eficacia de estos, depende en gran medida de su contacto con los microorganismos. Esta interacción puede verse mermada por el aprisionamiento de las bacterias en micronichos protectores en los materiales y/o la presencia de estructuras de resistencia (biopelículas) que las contienen y protegen. La sobrevivencia y colonización de una bacteria en un material inerte, depende de las características físicas y químicas del material y de su capacidad de adhesión al sustrato, este fenómeno está en gran medida determinado por las características propias del germen.

Este trabajo pretende: 1) evidenciar la diversidad genética de las cepas bacterianas recuperadas de una planta productora; 2) investigar la capacidad de *Leuconostoc* spp., para adherirse, colonizar y formar biopelículas en superficies, así como, evaluar su susceptibilidad a germicidas, y finalmente; 3) determinar si las características fenotípicas de cada cepa, están asociadas a su genotipo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Productos cárnicos. Generalidades.

La conservación de la carne ha sido desde tiempo inmemorial un recurso de la humanidad para disponer de alimentos en momentos críticos. El origen de los embutidos se pierde en la más remota antigüedad. Actualmente sabemos que su calidad depende de las técnicas de preservación, aplicadas rápidamente después del sacrificio. La preservación de la carne y sus productos, puede lograrse mediante procedimientos tales como, la congelación o refrigeración, envasado al vacío, curación, cocción, fermentación, ahumado o desecación. Actualmente existe una gran diversidad de productos cárnicos procesados, con mayor vida de anaquel que la carne cruda. La tecnología vigente de alimentos, permite esta diversificación, dentro de una amplia escala de precios.

Según el nivel de producción y comercialización, los derivados cárnicos embutidos y cocidos, se han logrado posicionar en el primer sitio de preferencia en el mercado nacional e internacional (ANTAD, 2007).

La salchicha, es uno de los productos cárnicos con mayor producción y demanda en el mercado, son elaboradas a base de carne de cerdo, de res, pollo o pavo (o mezclas de estas según tipo y estabilidad física) e incluye algunos aditivos como agua, grasa, sal común, especias y otras sales de curado, mezcladas en conjunto formando una emulsión. Generalmente en forma alargada y cilíndrica, aunque actualmente, existen marcas comerciales, que lo ofrecen en forma rectangular semi-plana. La emulsión cárnica con la que son fabricadas, se introduce en una envoltura, tradicionalmente de intestino de animal, aunque actualmente se utiliza el colágeno, celulosa e incluso plástico. Una vez embutido el producto sufre un proceso de cocción, enfriado y envasado. Cuando este tipo de productos se envasan al vacío, aumenta su vida de anaquel, ya que la baja tensión de oxígeno inhibe la proliferación de diversos microorganismos, durante su manejo y conservación en refrigeración (PROFECO, 2008).

2.2. Producción industrial y consumo de salchicha

La elaboración de embutidos fue considerado en la antigüedad un arte plebeyo. Hoy en día, es ya un complejo proceso tecnológico. Actualmente se tienen más de 1500

tipos de salchicha en el mercado mundial, siendo el tipo más comercial el Viena (ANTAD, 2007).

En México, existen más de 30 empresas que elaboran salchicha para su venta al público (PROFECO, 2008).

La industria alimenticia en nuestro país ha crecido enormemente, como respuesta a la demanda de alimentos que minimicen el tiempo en su preparación. Por lo que la producción de embutidos en México incrementó sustancialmente en el periodo de 1994-2007 (Figura 1).

La línea muestra la producción mensual comparada con lo reportado para 1993, que se considera el 100% (INEGI, 2008). Claramente es observable que en poco más de una década, la producción de embutidos se duplicó.

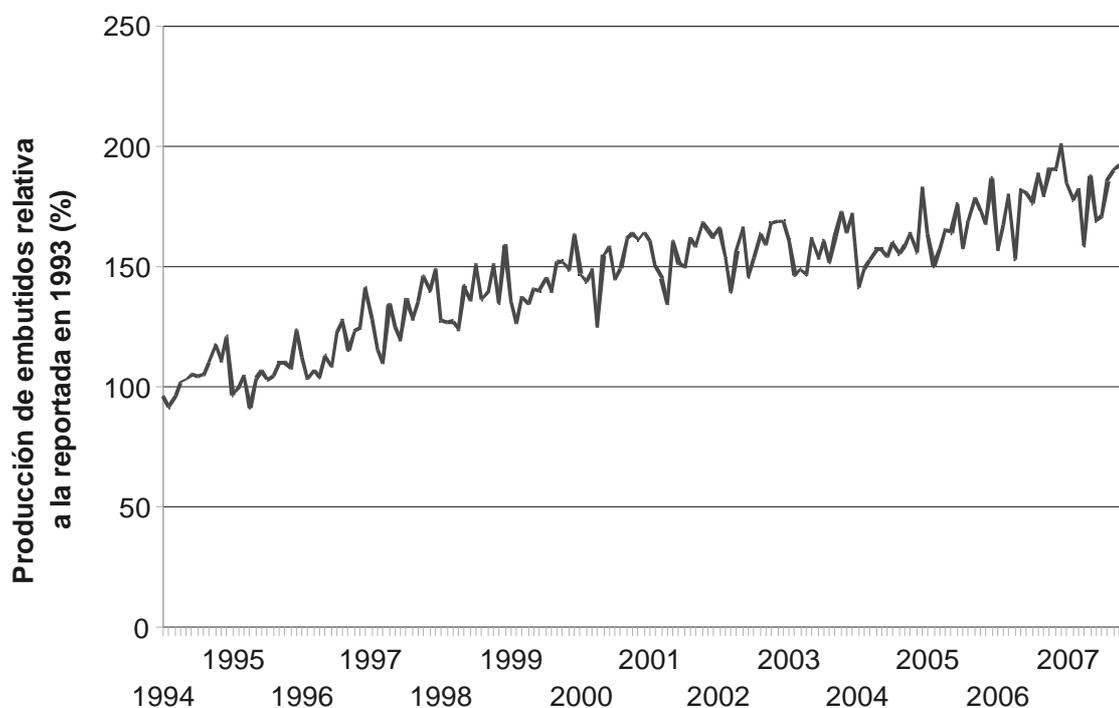


Figura 1. Producción de embutidos en México (1994-2007)
Fuente: INEGI, 2008

En este contexto, las salchichas se han convertido en uno de los embutidos de mayor consumo en México (PROFECO, 2009). Para sustentar lo anterior basta un dato: en enero de 2005, el Laboratorio Nacional de Protección al Consumidor de PROFECO reportó haber analizado en su estudio de calidad 46 marcas de salchichas. En el mes de diciembre de 2007, en el estudio de calidad de la misma institución, reportó 80 marcas de salchichas. Es decir, el número prácticamente se

duplicó en tan sólo dos años, lo que habla de la gran demanda que tienen estos productos entre el público consumidor mexicano.

¿Por qué consumimos tantas salchichas? Probablemente porque suelen ser baratas, son sabrosas y muy fáciles de cocinar y en combinación con la salsa de tomate, suelen ser un platillo predilecto de niños, adolescentes y de no pocos adultos.

En los adultos, el ritmo de vida acelerado de las grandes ciudades, ha generado que los alimentos expedidos en establecimientos de comida rápida (hamburguesas, hot-dogs, pizzas, tacos) y los alimentos de preparación rápida (embutidos, carnes frías, sopas instantáneas, entre otras), sustituyan a los platillos tradicionales de elaboración más complicada. Y si bien la comida rápida es una opción para ganarle tiempo al reloj, se ha demostrado que es densamente energética (alta en grasas y carbohidratos y baja en fibra), por lo que su consumo frecuente o exclusivo ha generado un incremento en la prevalencia de sobrepeso, obesidad y alteraciones metabólicas (Barquera *et al.*, 2005; Barajas-Vega *et al.*, 2010). Añadámosle, que cada vez tenemos un estilo de vida más sedentario.

Un serio problema en la cultura de nuestro país, es que el consumidor generalmente nunca verifica los ingredientes del producto que adquiere, ignora la calidad y cuantía de los ingredientes que contiene, menos del 5% de la población revisa fecha de fabricación del producto, y sólo el 18%, observa la fecha de caducidad y lote antes de comprarlo (PROFECO, 2005). Adicional a esto, debido a la falta de regulación que existe en nuestro país con respecto a las salchichas, entre el público consumidor existe confusión de la presentación de las salchichas (las hay Viena o Frankfurt, coctelera, para hot dog, botanera, para asar, etc.) y su composición (cerdo, pavo, res, pollo o mezcla de estas carnes). Más allá de la presentación, la composición de la salchicha es lo que debe guiar la elección del consumidor. Sin embargo, este producto aun se sigue ofreciendo a granel, y no siempre es posible ver la etiqueta. Evidentemente, la mayor parte de la población, toma como criterio de selección, apreciaciones organolépticas (tamaño, color, olor, sabor, entre otras), pero sobre todo precio.

En discordancia, con el incremento en el consumo y la producción de salchicha en México, la normatividad oficial para estos productos es limitada y no ha presentado modificación, no se diga ya, actualización. Las normas de observación vigentes en nuestro país, están enfocadas a especificaciones sanitarias y métodos de prueba para productos cárnicos procesados, en general (NOM-122-SSA1-1994; NOM-213-

SSA1-2002), límites de tolerancia de aditivos y sus métodos de verificación (NOM-002-SCFI-1993), y especificaciones generales de etiquetado para alimentos en general (NOM-051-SCFI-1994). Es notorio el desorden existente en el mercado de estos productos, dado que diversas marcas, tienen composiciones diferentes y todas usan por igual la denominación salchicha. La norma de observación voluntaria, de referencia, sobre especificaciones de calidad de la salchicha (NMX-F-065-1984), es muy antigua y no considera las innovaciones tecnológicas en la industria, por lo que los fabricantes no se acogen a ella. Es necesario y urgente que la Dirección General de Normas la actualice, para que se regule el mercado.

Actualmente, es la industria alimenticia quien atiende mayormente por interés económico las necesidades de mejorar la calidad y estabilidad de su producto. Eventualmente, algunas acciones encaminadas a procurar la calidad, también influyen positivamente en la inocuidad del producto (Fernández-Escartin, 2009). Aun cuando productos cárnicos cocidos reciben un eficiente tratamiento térmico de cocción, y se les adiciona humo líquido (con reconocido efecto antimicrobiano por su contenido de fenoles y ácidos orgánicos), las salchichas no son alimentos estériles. Por lo tanto, es labor inherente a su producción, elaborarlos con una carga microbiana mínima hasta su empaque, limitando su desarrollo durante la comercialización mediante refrigeración.

2.3. Microbiología y deterioro de la salchicha.

Una gran variedad de microorganismos son capaces de colonizar y crecer en los alimentos. Muchos alimentos por sí mismos, proporcionan un medio apto para sostener el desarrollo bacteriano. Eventualmente la actividad de estos en el alimento, sugiere una reducción en la calidad.

Los alimentos deteriorados, no representan necesariamente un peligro para la salud, cabe resaltar que la mayoría de los patógenos no suelen deteriorar el alimento aun cuando desarrollan en él y los deterioradores aunque alcancen un número alto, no causan un daño a la salud. Sin embargo, los alimentos deteriorados, generalmente se consideran no aptos para el consumo y no deben distribuirse o consumirse.

Las salchichas desde la obtención de sus materias primas, son contaminadas con una gran variedad de microorganismos. Una combinación de diversos factores intrínsecos y extrínsecos interaccionan para seleccionar algunos grupos bacterianos con mayor capacidad para competir, sobrevivir y/o desarrollar a en el ambiente de procesamiento de los alimentos (Buchanan, 1996).

Las salchichas reciben un tratamiento térmico para cocción, que rebasa los 70°C, lo que generaría un producto cercano a la esterilidad comercial. Sin embargo, la recontaminación postratamiento de cocción por el ambiente o equipo, puede introducir una amplia variedad de microorganismos (Von Holy, 1992). La carga microbiana final del producto, guarda relación con la eficiencia de las medidas que se pongan en operación para controlar esas fuentes de contaminación.

En un estudio realizado por Von Holy *et al.* (1992), donde analizaron muestras ambientales de una empresa productora de salchichas, encontraron además, de un gran número de bacterias Gram negativas, un amplio espectro de bacterias ácido lácticas, las cuales comprendían tanto bacterias homo- como heterofermentativas; *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, entre otros. En general, a partir de todas las superficies ambientales de la planta, pudieron aislar al menos dos géneros, *Lactobacillus* homofermentativos y *Leuconostoc*, con una gran capacidad de generar deterioro en la salchicha tipo Viena empacada al vacío.

2.3.1. *Leuconostoc* spp. como potencial deteriorador

Aunque la población de bacterias ácido lácticas en salchicha empacada al vacío recién elaborado es usualmente por debajo del límite de detección (<10 UFC/g), su número puede incrementar durante el almacenamiento del producto en comercialización, hasta 10⁸ UFC/g, lo que eventualmente se asocia con el deterioro (Chenoll *et al.*, 2007). Los cambios sensoriales pueden ir desde un olor desagradable, hasta un sabor agrio, aparición de líquido lechoso y mucosidad (Korkeala *et al.*, 1998).

Leuconostoc es un género perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas. Ver especies de *Leuconostoc* en el Cuadro 1. Las especies de *Leuconostoc* tienen generalmente forma cocoide y usualmente forman cadenas. Son resistentes intrínsecamente a la vancomicina, son catalasa-negativos (lo cual los distingue de *Staphylococcus*), heterofermentativos y capaces de producir dextranas a partir de la sacarosa. Aunque inicialmente se consideraban comensales no-patógenos en humanos, desde la descripción en 1985 del primer caso de bacteriemia por *Leuconostoc*, algunas especies se reconocen como patógenos oportunistas no asociados con el consumo de alimentos. Estas son capaces de producir infecciones a los seres humanos inmunodeprimidos o comprometidos inmunológicamente (Madigan *et al.*, 2004)

Cuadro 1. Especies de *Leuconostoc*.

Especies	
<i>Lc. carnosum</i>	<i>Lc. inhae</i>
<i>Lc. citreum</i>	<i>Lc. kimchii</i>
<i>Lc. durionis</i>	<i>Lc. lactis*</i>
<i>Lc. fallax</i>	<i>Lc. mesenteroides subssp.</i>
<i>Lc. ficulneum</i>	<i>mesenteroides y dextranicum</i>
<i>Lc. fructosum</i>	<i>Lc. oenos</i>
<i>Lc. garlicum</i>	<i>Lc. pseudoficulneum</i>
<i>Lc. gasicomitatum</i>	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>
<i>Lc. gelidum</i>	

* Comprobado su potencial como deteriorador.

Fuente: Madigan *et al.*, 2004, Cepeda-Márquez *et al.*, 2008.

Un estudio realizado por Chenoll *et al.* (2007), mostró que los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* fueron la flora dominante, sobre otras BAL, en cuatro grupos de productos cárnicos (embutidos y cocidos), analizados durante su almacenamiento, que además, mostraron síntomas claros de deterioro, como gasificación y aparición de líquido viscoso y lechoso en el empaque. En concordancia con los resultados reportados por otros autores, que evidenciaron la presencia de estos mismos microorganismos en productos cárnicos (Borch *et al.*, 1996; Björkroth *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2005).

Leuconostoc fue el género dominante en salchicha empacada al vacío deteriorada en varios estudios (Yost y Nattress, 2002; Cepeda-Márquez *et al.*, 2008; Vihavainen, *et al.*, 2008). Sin embargo, esto no significa que la sola presencia del género en el producto lo condene al deterioro durante su almacenamiento. El desencadenamiento de este acontecimiento está influenciado por las prácticas de comercialización a las que sea expuesto. Es de conocimiento general, que la composición de la fase gaseosa dentro del empaque durante su almacenamiento, genera una atmósfera favorable para el desarrollo de algunas bacterias eventualmente presentes en el producto, tales como, *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* atípicos, como *Lb. curvatus* o *sakei*. Dada su capacidad para tolerar atmósferas reducidas de oxígeno y su carácter psicrótrofo, estas bacterias pueden desarrollar en el producto empacado al vacío y eventualmente producirles deterioro en mayor o menor grado, según su tiempo de almacenamiento.

Cepeda-Márquez *et al.* (2008), encontró que una mezcla de cepas de *Lc. mesenteroides* inoculadas en salchicha que posteriormente fue empacada al vacío, tenía capacidad de producir una intensa gasificación tras su almacenamiento a 7 y 22°C, apareciendo estos signos desde los 20 y 7 días de almacenamiento, respectivamente. La presencia evidente del líquido lechoso, fue mayormente

presentada en las salchichas empacadas al vacío inoculadas con *Lc. lactis* desde el día 18 y 5 del almacenamiento a 7 y 22°C, respectivamente. Lo que demuestra el potencial deteriorador de algunas especies del género *Leuconostoc*.

2.3.2. Impacto económico del deterioro de la salchicha

Los alimentos deteriorados, generalmente se consideran no aptos para el consumo. El costo económico del producto deteriorado, no sólo involucra el retiro del producto dañado del mercado, sino también su posible sustitución por uno nuevo, en el punto de venta. No obstante, las pérdidas económicas no sólo atañen a los productores, sino también a los distribuidores e incluso a los consumidores, ya sea por la elevación de precios o la restricción de su abastecimiento, o por simple pérdida del producto en conservación en su cocina (Fernandez-Escartin, 2009).

Un eficiente control de alimentos desde su fabricación, permite disminuir las pérdidas económicas por deterioro, principalmente en las fases de transporte y almacenamiento en los centros de acopio y abasto (FAO, 1996; Comisión del Codex Alimentarius, 1995). Esto contribuye a abatir el problema de deterioro que ocasionalmente irrumpe de forma explosiva en una industria.

Una empresa mexicana productora de salchichas presentó una pérdida de producto por deterioro microbiano, noviembre de 2006 y enero del 2007, equivalente a 5.61 ton y 18.82 ton en el periodo comprendido entre noviembre del 2007 a febrero del 2008, ambas cantidades son escandalosas, dada la merma económica que produjo, ya que se calculó que el último brote, alcanzó casi un cuarto de millón de pesos en pérdida (Informe financiero, confidencial).

Actualmente la industria de carnes frías, se ve afectada por fallas y/o carencias en la cadena de frío durante la comercialización del producto, lo cual compromete la conservación del producto terminado (FAO, 1996). Un control exhaustivo de las buenas prácticas de manufactura y sanitarias en la elaboración de la salchicha, así como, la implementación de barreras que controlen eficientemente el deterioro prematuro, son acciones que pueden garantizar al mercado, no sólo productos de buena calidad, sino también de aceptable estabilidad comercial.

2.4. Prevención y control de deterioro de la salchicha durante su comercialización

Para retrasar la descomposición de los productos cárnicos por causas microbianas se dispone de tres recursos no excluyentes entre sí: 1) llevar a cabo prácticas sanitarias en su elaboración que mantengan baja la población microbiana, incluyendo el evitar la recontaminación post-cocción; 2) aplicar un tratamiento químico o térmico que disminuya o elimine la flora microbiana presente en él, y finalmente; 3) la conservación a bajas temperaturas durante su comercialización y así abatir la tasa de multiplicación microbiana.

La estabilidad de la salchicha empacada al vacío depende principalmente del nivel de A_w y pH, así como de la temperatura de almacenamiento. El potencial psicrótrofo de *Lc. mesenteroides* limita las opciones para controlar el deterioro, dado que aun las temperaturas más bajas (0°C), no garantizan la inhibición total de la actividad bacteriana (Korkeala *et al.*, 1990).

Una estrategia viable que ha adoptado la industria de salchichonería, es la incorporación de agentes químicos a la formulación de su producto.

Por norma general la eficacia de un conservador depende de su concentración en el alimento. Dentro de ciertos límites, cuanto mayor sea su nivel, mayor será la inhibición del desarrollo. Generalmente se utiliza en cantidades que no dañen la calidad nutritiva, sensorial e inocuidad del alimento. El objetivo es que el conservador mantenga su efecto inhibitorio hasta que se consuman. El empleo de conservadores sólo tiene sentido cuando se utiliza como complemento a adecuadas prácticas sanitarias de operación, ya que existe la posibilidad de que la contaminación generada por diversas fuentes operando durante su producción, propicien que el número de microorganismos en un producto sea tan elevado que el conservador no lo pueda controlar. Es decir, de ninguna manera es excluyente, el incorporar conservadores a los alimentos, y el mantener en condiciones de sanidad y libre de microorganismos los equipos de producción.

2.4.1. Control de microorganismos instalados en equipos y utensilios en la industria alimenticia mediante desinfección.

Tanto en la industria alimenticia, como en la producción artesanal de alimentos, la desinfección de materiales, utensilios y equipos, ocupa desde hace mucho tiempo un inamovible primer lugar en el marco de las medidas de prevención de contaminación microbiana hacia los alimentos. En la actualidad se cuenta con un basto conocimiento

sobre los agentes químicos que se emplean como germicidas, esto ha facilitado la elección de los procedimientos de desinfección para las diversas áreas de trabajo dentro de la industria de alimentos. Sin embargo, la utilización indiscriminada de agentes germicidas, ha provocado la adaptación y eventual resistencia a estos, por parte de los microorganismos presentes en los equipos. De acuerdo con esta concepción, es necesario evaluar para cada empresa, la flora presente en sus equipos de producción, y finalmente la susceptibilidad de estos microorganismos a los agentes germicidas empleados para su control, con la finalidad de proveer de opciones de rotación de germicidas, con aceptable eficiencia sobre el control de la flora particular instalada en la planta alimenticia.

La aplicación de germicidas como el cloro (200ppm), agua electrolizada ácida, neutra y/o alcalina (40-500ppmCl⁻/Eh>1000mV), ácido peroxiacético (80ppm) y ácido láctico (2%), se han reportadas como concentraciones útiles para el control y eliminación de microorganismo en superficies inertes (CFSAN/FDA, 2001). Sin embargo, se cree que la actividad de estos germicidas puede verse mermada en función de la capacidad de instalación de las bacterias en la superficie y su resistencia inherente (Costerton *et al.* 1999; Donlan y Costerton, 2002; Dunne, 2002).

2.4.1.1. Formación de biopelículas en superficies del equipo de producción

La llegada de un microorganismo al equipo de una industria de alimentos, depende de las fuentes y mecanismos de contaminación que operen en el proceso. Una vez en el equipo, el germen puede sobrevivir, multiplicarse o inactivarse, destino que depende de las características propias del microorganismo, sustrato y de las condiciones que prevalezcan en su entorno. Cualquiera que sea la situación, la primera etapa para la formación de ese micronicho, es la adhesión. Este fenómeno ha sido estudiado ampliamente en superficies inertes y en alimentos (Barbara-Vu *et al.*, 2009). La adhesión bacteriana a una superficie es un proceso secuencial. Inicialmente las bacterias se adhieren débilmente (reversiblemente) y en función del tiempo puede evolucionar a una adhesión irreversible, como consecuencia de la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE, exopolisacáridos) (Hernandez-Iturriaga *et al.*, 2003; Barbara-Vu *et al.*, 2009).

Diversos factores influyen en la adhesión bacteriana a las superficies: el historial, concentración inicial y naturaleza de la cepa; hidrofobicidad (cargas electrostáticas) y estructura del material inerte, así como, tiempo de contacto, temperatura, humedad y pH óptimo. Además, configuran el efecto de adhesión o no y su posterior formación de estructuras tridimensionales como biopelículas, si se cuentan con las condiciones ambientales favorables para la colonización. Una biopelícula es una matriz organizada, constituida principalmente por polisacáridos, hidratada y predominante aniónica, en la cual un grupo de microorganismos se encuentran inmersos (Costerton *et al.*, 1995).

El efecto de adhesión tiene acentuada repercusión en la industria de alimentos, ya que los microorganismos adheridos muestran una acentuada resistencia a los germicidas empleados en los programas de saneamiento de equipo y utensilios (Carpentier y Cerf, 1993; Flemming, 2002). Frente a esta problemática, la mejor medida a la que se puede recurrir es la prevención de la formación de biopelículas, ya que una vez conformadas se dificulta su remoción (Fernández-Escartin, 2009).

Aunado a esto las biopelículas pueden afectar la transferencia de calor a través de las superficies y propiciar la corrosión en el equipo, lo cual genera a su vez otro inconveniente para la industria alimenticia (Carpentier y Cerf, 1993; Flemming, 2002).

En el contexto relacionado directamente con el deterioro y la inocuidad de los alimentos, es indispensable mencionar que una gran cantidad de bacterias tienen

capacidad para adherirse a la superficie de materiales de uso común en la industria de los alimentos; tal es el caso, del acero inoxidable, vidrio, plástico, hule, incluso teflón antiadherente (O'Toole *et al.* 2000; Stoodley *et al.* 2002; Arevalos-Sanchez *et al.*, 2010). Son superficies en donde pueden multiplicarse y dar lugar a asentamientos de variada magnitud y permanecer firmemente adheridas y metabólicamente activas, con la posibilidad de un eventual desprendimiento y contaminación puntual y distante del equipo. Esto finalmente podría ser causa de un esporádico brote de deterioro de unidades de un alimento, componentes de un lote de producción.

Para prevenir la formación de biopelículas en la industria de alimentos es necesario un adecuado proceso de limpieza y desinfección. La desintegración de esta matriz estructural mediante métodos mecánicos o químico es esencial para mitigar el problema. Es decir, de omitirse el tratamiento mecánico previo, el desinfectante presentará un deficiente o nulo efecto sobre las células componentes de la biopelículas. Algunos métodos físicos empleados en la disgregación de estas estructuras incluyen el uso de campos magnéticos de alta intensidad, ultrasonido y campos eléctricos, en todos los casos en combinación o no, con ácidos orgánicos y/o el germicida (Carpentier y Cerf, 1993).

Como ya se ha mencionado, las características que exhiben las bacterias, están en función de su historial y naturaleza. Entendiéndose por historial, las condiciones adversas u óptimas a las que fueron expuestas, que eventualmente les provee de cierta resistencia a diversos factores ambientales.

Es presumible que entre los individuos de una misma especie, hay subgrupos y miembros que han logrado adaptarse a un hospedero o ambiente en particular. Es viable también que, una segunda progenie de estos organismos, será genéticamente idéntica a él, es decir, con las características adquiridas como factores de resistencia. Finalmente las características incluidas en su genoma, pueden expresarse como capacidad para tolerar la acción de germicidas que se emplean para su control.

2.4.1.2. Resistencia de los microorganismos a la acción de germicidas

Resistencia es la capacidad temporal o permanente de un microorganismo y su progenie para seguir siendo viable y/o multiplicarse en condiciones que destruyen o inhiben a los demás miembros de la cepa (Cloete *et al.*, 2003).

Los microorganismos tienen la capacidad inherente de evolucionar y así adaptarse a los factores ambientales de estrés, lo que les permite sobrevivir en

condiciones que de otra manera les sería letal. El uso indiscriminado de antimicrobianos en la producción de alimentos, puede llevar a la selección de cepas resistentes, comprometiendo así la posibilidad de controlarlos. Inevitablemente también impacta a la salud humana, económica y el medio ambiente.

La resistencia a antimicrobianos puede ser clasificada en función a sus factores determinantes como innata, adquirida y adaptación. La resistencia innata: es controlada a nivel cromosómico (Russell, 1991), generalmente está relacionada con la fisiología de un microorganismo que se expresa como mecanismo de defensa y finalmente, es la responsable de las diferencias observada entre los diferentes géneros, especies y cepas de microorganismos que se han expuesto a diferentes condiciones ambientales; adquirida: es resultado de cambios genéticos que ocurren a través de mutaciones o la adquisición de material genético como plásmidos o transposones que contienen las secuencias que codifican para la resistencia (Roe y Pillai, 2003; Russell, 1997; Russell y Chopra, 1996). La resistencia a los antibióticos, ha sido bien estudiada; no obstante, para germicidas su estudio ha sido limitado; y finalmente la adaptación: este efecto puede generarse por la exposición de un microorganismo a un incremento gradual en la concentración de la sustancia inhibitoria, sin embargo, este efecto es generalmente reversible, es decir, el microorganismo puede volver al fenotipo sensible cuando se crece en un medio libre del agente estresante (Russell, 1991).

Los mecanismos por los cuales las bacterias generan resistencia a antimicrobianos son muy diversos. Estos pueden incluir la inhibición de varios pasos en la replicación, transcripción y traducción del ADN, o aparecer a nivel de la pared o la membrana celular. Las estrategias de las bacterias para resistir los efectos de los antimicrobianos incluyen la alteración, modificación o la sobreproducción de receptores externos de antimicrobianos, que derivan posteriormente a la ausencia de enzimas o rutas metabólicas (Russell *et al.*, 1997). Además, las bacterias pueden cambiar la permeabilidad de su membrana a los antimicrobianos y finalmente permitir su salida del citoplasma (Cloete, 2003; Dever y Dermody, 1991).

Existen mecanismos mediante los cuales los microorganismos que son resistentes a alguno de los antimicrobianos puede volverse resistente a los demás (Yousef y Juneja, 2003). La exposición a concentraciones subinhibidoras de un antimicrobiano, por ejemplo, puede activar los mecanismos de resistencia innata, disminuyendo así la susceptibilidad al agente y produciendo en “tándem” una

disminución de la susceptibilidad hacia otros antimicrobianos. Por otro lado, la resistencia a varios antimicrobianos no relacionados o de diferente mecanismo de acción puede ser el resultado de una co-selección, que implica la vinculación secuencial de distintos genes que le confieren resistencia a antimicrobianos o factores estresantes diferentes. A menudo la información secuencial de resistencia a estos se encuentra en plásmidos o integrones, y generalmente son transferidos juntos.

Aunado a esto, también existe la posibilidad de generación de resistencia cruzada, que es la aparición de resistencia simultánea diversos factores que tienen los mismos objetivos a nivel molecular. La protección cruzada se produce cuando la adaptación a un agente estresante se asocia con una mayor resistencia hacia otro agente, es decir un factor del estrés no relacionado (Fernandez-Escartín, 2009). Este fenómeno ha sido reportado para diferentes microorganismos y factores de estrés. Sin embargo, es limitada la información sobre los mecanismos que los rigen.

La resistencia de los microorganismos, se puede detectar fenotípicamente o bien genotípicamente. La detección fenotípica suele realizarse empleando métodos estandarizados de pruebas de susceptibilidad. Esta determinación utiliza evaluaciones en caldo o por difusión en agar mediante discos impregnados con el agente.

Por otro lado, con un enfoque molecular, se ha empleado el análisis del ADN total de la bacteria procesado mediante técnicas de tipificación, para agrupar individuos en géneros, especies y subgrupos de cepas con características genotípicas similares, asociándolos a las facultades fenotípicas predominantes de ese grupo. Por otro lado, en un enfoque más estricto, se ha investigado la presencia de genes de resistencia, mediante técnicas moleculares estándar, como la reacción en cadena de la polimerasa o la hibridación ADN-ADN, que detectan genes específicos que codifican la resistencia (Call *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004).

Finalmente es ya bien sabido que la susceptibilidad a un germicida específico varía entre los microorganismos; algunos se inactivan inmediatamente después al contacto con la solución germicida y en otro extremo pueden existir sobrevivientes aún después del tiempo de aplicación recomendado. Finalmente hay que tener presente que el uso frecuente de un germicida puede generar la selección de cepas con la mayor resistencia. Por lo que la rotación programada de germicidas contribuye a mitigar el problema.

También es necesario advertir que la microflora presente en la industria de alimentos presenta (dado su exposición a diferentes factores) una gran diversidad de respuestas y podría contrastar con las cepas de colección que se emplean como referencia en el laboratorio (Chapman, 1998). Por lo que se sugiere para obtener resultados más confiables se utilicen cepas nativas de la industria en la evaluación de germicidas. De forma complementaria es necesaria la evaluación periódica de la eficiencia de los germicidas que se emplean en la industria.

2.4.1.3. Biodiversidad de los microorganismos y su implicación para la industria alimenticia

Los microorganismos son los seres más numerosos que existen en el planeta; son organismos ancestrales que han colonizado cada nicho ecológico posible. Los microorganismos se encuentran prácticamente en todas las regiones desde los polos, en ambientes acuáticos y muy secos. Su presencia y actividad es esencial para la salud y adecuado funcionamiento de los ecosistemas (Olembo, 1991).

La capacidad de los microorganismos para desarrollar tal variedad de funciones se debe a su gran versatilidad bioquímica, basada en la posibilidad de llevar a cabo una enorme cantidad de tipos de reacciones, oxidaciones, reducciones y precipitaciones, sobre los elementos componentes de lo que llamamos vida, y que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos de la tierra (Olembo, 1991).

Desde el punto de vista genético se debe tener en mente que cada secuencia de ADN es única, con lo cual la desaparición de cualquier especie biológica implica la pérdida irreversible de un conjunto único de información. Esto es aplicable a todo organismo viviente y por tanto, también a los microorganismos. El anterior ensamblaje de genética y funcionalidad lleva a hablar de biodiversidad. Pero, ¿Qué contempla dicho término?; biodiversidad, es la variedad y variabilidad de todas las formas de vida, el complejo ecológico en el cual están presentes y los procesos de los que forman parte (Olembo, 1991).

Las bacterias se basan en sus "memorias" para ajustar su capacidad para el sentido de alimentación y del peligro. En este contexto, la biodiversidad se genera como un instinto innato por sobrevivir, es decir, involucra un estado de adaptación al ecosistema, sus habilidades para lograr este objetivo estarán por tanto, en función de su historial de exposición a los factores ambientales.

La capacidad de adaptación, resultado de su instinto de sobrevivencia, dificulta su control en los procesos de producción de alimentos donde su actividad y/o presencia es indeseable.

En la industria alimenticia, los principales problemas a los que se enfrenta cuando se desea controlar a los microorganismos en sus instalaciones son: la gran diversidad de microflora en su proceso y la diferente susceptibilidad ante los agentes que se emplean para su control, ambos problemas generados por su gran capacidad de adaptación.

La naturaleza pese a los esfuerzos para controlar la actividad de los microorganismos, siempre les brindará facultades para esquivar los obstáculos que se les imponga; sin embargo, es deber de toda industria alimenticia controlar en medida de lo posible la presencia de microorganismos indeseables en su proceso y producto.

2.5. Identificación de fuentes y reservorios de contaminación por *Leuconostoc* spp. en una planta productora de salchichas.

Un estudio previo llevado a cabo por Cepeda-Márquez, *et al.* (2008), en el Laboratorio de Inocuidad Microbiana de Alimentos, de la Universidad Autónoma de Querétaro, en una planta productora de salchicha, en el cual se analizaron 144 muestras de materiales, utensilios, equipo y producto en proceso y terminado, recolectadas del área de recepción de materias primas, molienda y mezclado, del área de corte y pelado y del área de empacado de salchicha. El objetivo fue detectar potenciales fuentes de contaminación de *Leuconostoc* spp. en la planta procesadora de salchichas. Se evidenció mediante PCR, la presencia del género tanto en producto en proceso y empacado, como en el equipo de producción.

La distribución y frecuencia de *Leuconostoc* en materiales y equipos en la planta, se observa en la Figura 2b y 2c. Encontrando que *Leuconostoc* (por PCR), está distribuido dentro de la planta, a lo largo de todo el proceso, en un 28% de las muestras (40/144) del equipo de producción, por lo que constituye una fuente potencial de contaminación al producto. Siendo “el cargador” el principal reservorio de *Lc. mesenteroides* (64% (n=28) de positividad). Es necesario resaltar, que se detectaron sobrevivientes de *Leuconostoc* al proceso de horneado/cocción (hasta 80°C) de las salchichas.

Se lograron identificar mediante el sistema semiautomatizado Biolog[®], especies de *Leuconostoc* tales como *lactis*, *fallax* y *mesenteroides* subespecies *dextranicum* y *mesenteroides*. En el mismo estudio se simuló el deterioro en

salchicha, producido por las cepas recuperadas, evidenciando, que *Lc. mesenteroides*, produce un patrón de deterioro similar/compatible con el deterioro de salchicha en comercialización, en años anteriores. Por otro lado, el germen tiene capacidad para sobrevivir al tratamiento térmico (de cocción de la salchicha) y posiblemente pueda encontrar condiciones para establecerse en nichos en el equipo.

Adicionalmente, las cepas de *Lc. mesenteroides* aisladas de la empresa, exhiben capacidad para desarrollar en las condiciones de almacenamiento y comercialización del producto, provocando el deterioro. Es importante señalar que la sola presencia de *Leuconostoc* en el producto no lo condena al deterioro. Es decir es compatible la concepción de un producto con números reducidos del deteriorador que se conduce de manera estable durante la vida de anaquel del producto. Sin embargo, la desatención de la temperatura, aunado a números altos del microorganismo en el equipo, que fortuitamente llegan a la salchicha de manera puntual en un lote de producción, puede conducir al acortamiento de la vida de anaquel del producto. Finalmente, para reducir la frecuencia de brotes de deterioro de la salchicha, es necesario implementar programas de vigilancia interna, con la finalidad de prevenir y/o eliminar los reservorios o fuentes de contaminación en la empresa. Así como optimizar las medidas de desinfección y considerar la aplicación de conservadores efectivos en el producto.

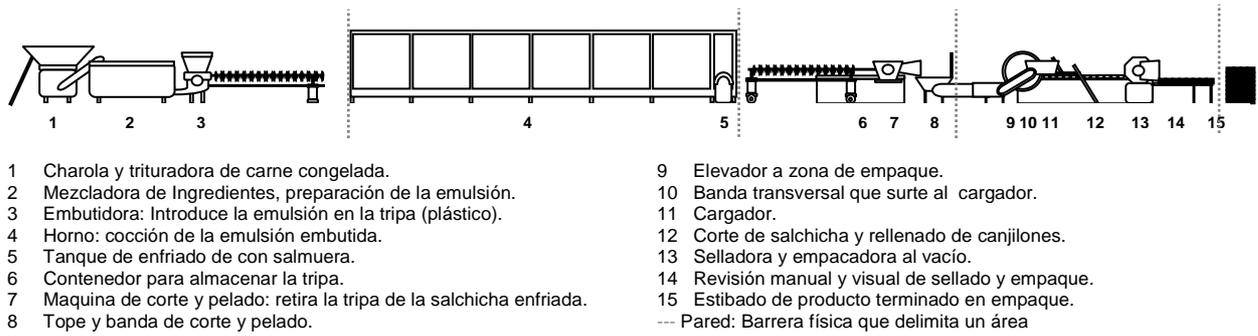


Figura 2a. Línea de producción de salchichas.

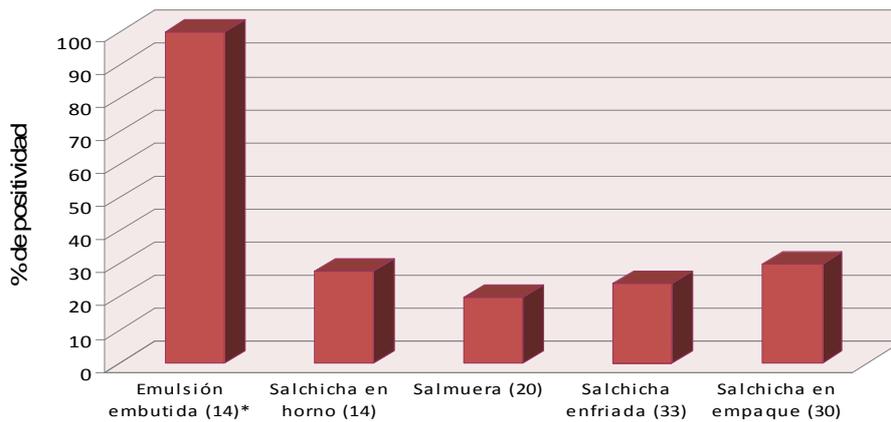


Figura 2b. Detección de *Leuconostoc* spp. por PCR en materiales obtenidos de la planta procesadora. * Total de muestras analizadas. Fuente; Cepeda-Márquez, *et al.*, 2008

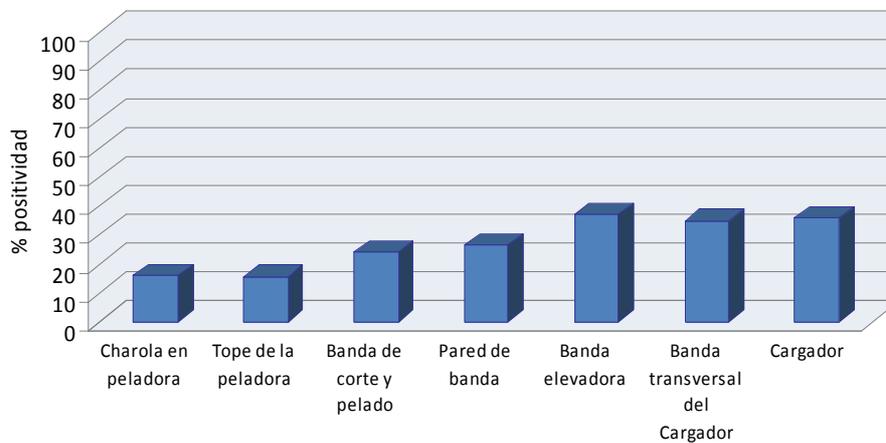


Figura 3c. Detección de *Leuconostoc* spp. por PCR en el equipo de la planta procesadora. Fuente; Cepeda-Márquez, *et al.*, 2008

La tipificación de las cepas aisladas de la planta, mediante técnicas moleculares, es una herramienta de gran utilidad para evidenciar reservorios o fuentes y mecanismos de contaminación, en el equipo.

2.5.1. Tipificación bacteriana (principios).

La investigación microbiológica con fines epidemiológicos requiere de métodos de tipificación de cepas. Estos métodos son capaces de discriminar entre cepas pertenecientes a una misma especie bacteriana en diferentes líneas clonales, es decir, grupos de bacterias originados a partir de un mismo clon inicial. Basándonos en esta definición de clon bacteriano, cepas aisladas en diferentes tiempos y lugares que presentan resultados idénticos utilizando diferentes métodos de tipificación, muy probablemente pertenecen a una misma línea clonal. La clonalidad implica la alta probabilidad de que dos cepas estén relacionadas, siendo la confianza de esta probabilidad cada vez mayor cuantos más métodos de tipificación sean utilizados. Es recomendable que en una investigación epidemiológica se utilicen una variedad de métodos de tipificación. La tipificación es de utilidad en la discriminación entre líneas bacterianas que se encuentran en diferentes hábitats u hospederos. Es presumible que entre los individuos de una misma especie, hay subgrupos y miembros que han adquirido adaptabilidad a un hospedero o ambiente en particular y es factible que, una segunda progenie de estos organismos, será genéticamente idéntica a ellos. Por lo que, su huella genética los hará diferentes a los mismos que no están adaptados a tales condiciones (Scott *et al.*, 2002).

Asumidas estas suposiciones, la tipificación puede proporcionar información sobre la distribución y permanencia de tipos microbianos (de diversos géneros, especies, variedades y/o clonas) en equipo e instalaciones de una planta procesadora de alimentos, lo cual puede ser aplicado en programas de vigilancia a nivel interno, con la finalidad de prevenir y/o controlar los reservorios o fuentes de contaminación latentes o continuas en la empresa. De especial interés, es el vincular cepas con misma huella genética, con características asociadas a la capacidad de deterioro, capacidad de formación de estructuras de resistencia o resistencia a conservadores y germicidas, como criterio de comparación. Lo que clarifica la posibilidad de observar puntos clave a controlar en el proceso de fabricación y la posibilidad de generar medidas preventivas, correctivas y de aseguramiento de calidad e inocuidad, adecuadas y dirigidas.

Un método de tipificación es aquel que puede ser usado para diferenciar cepas bacterianas a nivel de clonas. La esencia del uso de estos métodos es la de ser capaz de comparar cepas y agrupar aquellas con “idénticos” perfiles de respuesta. Cuando dos cepas estudiadas muestran resultados diferentes según uno o más métodos de tipificación, en general puede concluirse que derivan de diferentes

líneas clonales. Sin embargo, para poder ubicar distintas cepas en una misma línea clonal se requieren resultados coincidentes en más de un método de tipificación. La obtención de conclusiones válidas se facilita si existe un conocimiento de la distribución de tipos relevantes en un área geográfica determinada, que permitan sentar las bases para establecer cuáles resultados de tipificación pueden ser comparados.

La reproducibilidad de una técnica, puede verse afectada tanto por variaciones en el método como por variaciones biológicas, que son más fácilmente detectables en el caso de los métodos fenotípicos. Con el tiempo (de semanas a años dependiendo de la cepa), los patrones de tipificación producidos con métodos basados en DNA presentan en algunos casos variaciones menores, por lo que al momento de analizar los resultados es importante considerar el tiempo transcurrido desde su aislamiento.

Los métodos de tipificación deben cumplir tres requisitos esenciales: 1) poder de tipificación (ser capaces de catalogar cualquier cepa en un tipo determinado); 2) poder discriminatorio (ser capaces de discriminar entre cepas no relacionadas); 3) reproducibilidad (ser capaces de brindar resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada obtenida de diferentes orígenes). Además de contar con estos requisitos, se considera también la sencillez de realización y de interpretación de resultados (Tenover *et al.*, 1997).

En general, los métodos fenotípicos tienen un poder de tipificación limitado, debido a que cada uno es aplicable a un número reducido de especies bacterianas (ej. serotipificación, fagotipificación), mientras que los métodos genotípicos son en general aplicables a cualquier taxón bacteriano (Tenover *et al.*, 1997).

La principal ventaja de los métodos genotípicos respecto a los fenotípicos tradicionales es su capacidad discriminatoria, logrando en muchos casos diferenciar entre cepas absolutamente idénticas fenotípicamente.

La sencillez de realización, incluyendo costos, complejidad técnica del método, dificultades de optimización, entrenamiento de personal, etc., es en general favorable a los métodos genotípicos, con la desventaja de que implican en general un elevado costo de inversión en equipamiento.

La sencillez de interpretación se relaciona con las dificultades y experiencia requerida para utilizar un método particular. Actualmente, la interpretación de los resultados de los métodos moleculares continúa siendo un área de activa discusión,

aunque varios métodos fenotípicos como la fagotipificación requieren gran experiencia para realizar e interpretar los resultados y aun así muchas veces sólo permiten obtener resultados ambiguos. Finalmente, los métodos genotípicos son sin duda más caros que los fenotípicos, sin embargo, suelen ser más rápidos y precisos.

La reproducibilidad de una técnica, puede verse afectada tanto por variaciones en el método como por variaciones biológicas, que son más fácilmente detectables en el caso de los métodos fenotípicos. Con el tiempo (de semanas a años dependiendo de la cepa), los patrones de tipificación producidos con métodos basados en DNA presentan en algunos casos variaciones menores, por lo que al momento de analizar los resultados es importante considerar el tiempo transcurrido desde su aislamiento.

Métodos fenotípicos. La aplicación de los métodos tradicionales de tipificación bacteriana juega un rol esencial en la investigación epidemiológica de casos esporádicos y brotes de ETA, por ejemplo para agrupar bacterias aisladas de un posible brote como pertenecientes a un mismo biotipo, serotipo, antibiotipo, y de ser aplicable fagotipo. En el caso de *Salmonella*, la estabilidad, reproducibilidad y capacidad de tipificación de estos métodos es muy satisfactoria. También estos métodos proveen de información útil cuando se aplican métodos genotípicos que buscan diferenciar entre cepas con idénticos perfiles fenotípicos, para establecer su clonalidad.

La biotipificación es hoy considerada insuficiente por su escaso poder discriminatorio y pobre reproducibilidad, ya que los microorganismos pueden alterar de forma impredecible la expresión genética. Sin embargo, Santos, *et al.*, (2005) reportaron una aceptable correlación entre la identificación bioquímica (fermentación de carbohidratos) y la caracterización genotípica mediante RFLPs de cepas de BAL aisladas de morcilla de burgos.

La tipificación por perfiles de sensibilidad a antimicrobianos también es de muy bajo poder discriminatorio, debido a que la resistencia a antimicrobianos muchas veces es portada por plásmidos que son fácilmente transferibles entre cepas y dependen de factores de selección para su estabilidad, por lo que muchas veces se pierden en los cultivos. Por esto la antibiotipia no es viable para ser utilizada como único método de tipificación ya que muchas veces cepas relacionadas y genéticamente indistinguibles pertenecen a antibiotipos diferentes y a la inversa, cepas no relacionados poseen el mismo perfil de resistencia, lo cual puede

representar la adquisición del mismo plásmido por cepas diferentes (brote plasmídico).

La serotipificación es uno de los métodos clásicamente utilizados para estudios epidemiológicos para muchas especies de bacterias, en especial patógenas. Continua siendo un método clave para la tipificación de cepas de *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*, y resulta de esencial valor para dirigir la investigación ulterior. La principal limitante consiste en mantener el stock de antisueros necesarios. Por otra parte, a partir del desarrollo de métodos de genotipificación se ha demostrado la existencia de varias líneas clonales dentro de un mismo serotipo, por lo que el poder discriminatorio de la serotipificación es insuficiente (Vogel *et al.*, 2000). Sin embargo, no se han reportado estudios en los que se emplee para identificar cepas de bacterias lácticas.

La fagotipificación implica la caracterización de cepas basada en la susceptibilidad a la infección por un panel definido de bacteriófagos. Dentro de los agentes de ETA este método es de especial aplicación a muchos de los serotipos de *Salmonella* incluyendo *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* siendo de los principales métodos de tipificación para estos serotipos. Resulta un método con importante poder discriminatorio, aunque ha sido demostrado que ciertos fagotipos (PT) pueden cambiar debido a procesos como la adquisición de plásmidos de resistencia o transposones. Cepas de *S. Enteritidis* PT4 se convierten a PT24 luego de la adquisición de plásmidos de resistencia del grupo de incompatibilidad *incN*, o en PT7 luego de mutaciones espontáneas en genes codificantes de lipopolisacáridos, convirtiéndose en cepas rugosas avirulentas. La fagotipificación resulta insuficiente cuando un determinado tipo prevalece en un área geográfica, como es el caso de *S. Enteritidis* PT4 en varios países europeos, en donde el aislamiento de este PT en una muestra no brinda información respecto al origen de la cepa (Vogel *et al.*, 2000).

Los métodos moleculares como la tipificación por perfiles proteicos, basados en la separación electroforética de proteínas de membrana externa, ha resultado útil en la caracterización de cepas de amplia distribución geográfica de *Salmonella* Dublin y *S. Berta*, pero no así para otros serotipos, compartiendo incluso el mismo perfil entre distintos serotipos. Sin embargo, han permitido discriminar aun entre cepas del mismo PT, estableciendo la existencia de líneas clonales diferentes.

Métodos genotípicos. En la medida en que se fueron desarrollando métodos de microbiología molecular, las técnicas electroforéticas utilizadas para la separación

de macromoléculas fueron aplicadas como métodos de tipificación. En los últimos 30 años se han desarrollado gran cantidad de sistemas genotípicos de caracterización de cepas, que se basan en propiedades que no dependen de la expresión de propiedades fenotípicas y que permiten con mínimas modificaciones ser aplicados con la misma metodología para una gran variedad de especies bacterianas. De éstos, surgen como métodos de elección para la tipificación de cepas bacterianas tres diferentes: perfiles plasmídicos, perfiles de restricción de DNA cromosómico y perfiles de amplificación génica basados en PCR. Las técnicas moleculares actuales han sido desarrolladas en los últimos años y se han empleado en diversos y numerosos campos de la ciencia. Tales técnicas permiten obtener la huella dactilar del genoma bacteriano o la caracterización de sus plásmidos; el análisis de ADN plasmidico y cromosómico empleando endonucleasas de restricción, mediante electroforesis convencional o la electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE); así como; Análisis de perfiles de restricción de RNAr (RFLP); y finalmente la Amplificación Polimorfa Aleatorizada de ADN (RAPD-PCR), entre otras técnicas relacionadas con la tipificación basada en la amplificación de ácidos nucleicos (Tenover *et al.*, 1997).

Las técnicas que evidencian un perfil de restricción de DNA cromosómico y/o aquellas que muestran un perfil de amplificación génica, actualmente suelen ser utilizadas en estudios clínicos para la delineación de patrones de colonización y para la identificación de fuentes de transmisión de microorganismos infecciosos, lo cual puede contribuir a un entendimiento de la epidemiología y patogénesis, ayudando con ello al desarrollo de estrategias de prevención de enfermedades (Struelens y MESGEM, 1996).

En síntesis, es necesario incluir análisis periódicos de la diversidad genética de los microorganismos de interés en la industria alimenticia para la detección de grupos de patógenos y/o deterioradores con tipos (huellas genéticas) similares y de origen común en espacio y tiempo, con la finalidad de advertir la permanencia de potenciales peligros microbianos en el ambiente de producción, y eventualmente prevenir brotes de ETAs o de deterioro del producto.

2.5.1.1. Amplificación Polimorfica Aleatorizada de ADN

La técnica de RAPD es simple y rápida. Ha sido aplicada para la delineación de huellas digitales genotípicas y el análisis de poblaciones genéticas de un amplio rango de patógenos microbianos, incluyendo bacterias, hongos y protozoarios (Struelens, 1998).

La discriminación entre patrones de bandas de las diferentes cepas, es buena y presenta una adecuada correlación, contra otras técnicas de genotipificación. Sin embargo, su reproducibilidad y su poder discriminatorio, es variable y esta en función al número y secuencia de los iniciadores arbitrarios y las condiciones de amplificación. Además de que requiere de instalaciones y personal con habilidades técnicas adecuadas, para ser estandarizado y así ofrecer una reproducibilidad óptima.

La tipificación con esta técnica se basa en la amplificación en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de baja selectividad, utilizando un iniciador simple de secuencia arbitraria, típicamente de 10 pares de bases. Después de varios ciclos de PCR, se obtiene un número variable de segmentos de ADN amplificados de varios tamaños (Struelens, 1998). Los productos resultantes del PCR pueden representar una variedad de fragmentos de ADN de diferentes tamaños que son visualizados a través de electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. Se han descrito con anterioridad las condiciones e iniciadores específicos para analizar cepas del género *Leuconostoc* (Giancarlo-Moschetti *et al.*, 2000).

Así mismo, se han desarrollado métodos de tipificación que combinan la restricción enzimática del DNA cromosómico con la amplificación por PCR, que están siendo evaluados para aislamientos de *Salmonella* (Olsen *et al.*, 1994). Son métodos más complejos que el RAPD que involucran mayor tiempo de realización y laboriosidad, ya que implican la restricción, la ligación de los fragmentos con espaciadores de DNA, y la amplificación posterior usando oligonucleótidos complementarios a las secuencias de los espaciadores. Este método denominado AFLP (amplified fragment length polymorphism, por sus siglas en inglés), aparece como una alternativa menos laboriosa que el PFGE pero también implica la adquisición de equipos de electroforesis sofisticados de alto costo (Olsen *et al.*, 1993).

En la actualidad el RAPD es considerado el método más adecuado para una tipificación comparativa rápida, pero inadecuado para bibliotecas de tipificación en programas de vigilancia epidemiológica, en comparación a la PFGE (Hilton *et al.*, 1997; Barrett *et al.* 2006).

2.5.1.2. Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (PFGE)

La electroforesis en gel por campos pulsados fue descrita en 1984 como una herramienta para examinar el ADN cromosómico de organismos eucariotas. Ha sido uno de los progresos más útiles de la epidemiología molecular en las décadas pasadas; emerge en los 90's como una técnica para evidenciar la huella dactilar, es considerada el estándar de oro para la tipificación molecular de microorganismos, ya que ha demostrado que es altamente efectiva para muchas especies bacterianas, tanto Gram-positivas (como *Staphylococcus* y algunos enterococos) como Gram-negativas (como *E. coli*, otras *Enterobacteriaceae*, y *Pseudomonas*) (Maslow *et al.*, 1993; Goering, 1993; Tenover *et al.*, 1994; Struelens y MESGEM, 1996).

En general, la PFGE es una de las técnicas de tipificación más reproducibles y altamente discriminatorias en comparación con otras técnicas moleculares (Struelens y MESGEM, 1996; Tenover *et al.*, 1997; Warner y Onderdonk, 2003).

En esta técnica, el genoma bacteriano, que típicamente es de 2,000 a 5,000 pares de kilobases (kb) en tamaño, es digerido con una enzima de restricción que presenta relativamente pocos sitios de reconocimiento y que genera aproximadamente de 10 a 30 fragmentos de restricción que van de 10 a 800 kb. Todos estos fragmentos pueden ser separados como un patrón de distintas bandas por PFGE, usando una cámara diseñada especialmente que cambia la dirección del campo eléctrico en el gel de agarosa o poliacrilamida, entre tres juegos de electrodos que forman un hexágono alrededor del gel (Tenover *et al.*, 1997; Warner y Onderdonk, 2003).

La preparación del ADN genómico y la macrorestricción son llevados a cabo en cubos de agarosa (<1cm de espesor). Utilizando unidades de electroforesis programables, los cambios de orientación periódica de los campos eléctricos o electroforesis en gel por campos pulsados, permiten la separación y determinación del tamaño de los fragmentos de macrorestricción. Esta técnica escanea más del 90% del cromosoma para reordenar fragmentos de gran tamaño tales como

duplicaciones, cancelaciones, o inserciones de secuencias que se detectan como un cambio en el tamaño o número del fragmento (Struelens, 2001).

Los patrones de restricción del ADN de las cepas en estudio son comparados unos con otros para determinar sus relaciones (Tenover *et al.*, 1995).

La PFGE se ha empleado en sistemas activos de vigilancia epidemiológica como el PulseNet, ya que compara rápidamente la huella genética de cepas de un brote de ETAs específico, con cepas bacterianas colectadas de uno u otros casos reportados, aun cuando no parezcan estar relacionados geográfica y temporalmente (Swaminathan *et al.* 2001; Barrett *et al.* 2006). En estudios de caracterización de cepas, la meta es determinar las relaciones filogenéticas que tienen estos organismos espacial y cronológicamente distintos, con las características propias de estos, y que finalmente les confieren capacidad para adherirse y colonizar un sustrato, y su resistencia a germicidas. Es por tanto necesario señalar que el uso y aplicación de la técnica de PFGE en la caracterización del ADN, es mucho más amplio, que la simple evaluación de la relación entre cepas de un brote.

Las principales dificultades asociadas con esta técnica son las demandas técnicas del procedimiento y costos iniciales del equipo. La preparación de ADN genómico hasta su restricción y separación requiere de 1 a 5 días, dependiendo de los organismos a examinar, y los costos del equipo requerido (incluyendo el aparato de electroforesis y el transiluminador) varían entre 10,000 y 20,000 dólares. Sin embargo, el método es operacional en el laboratorio, y puede ser aplicado a un amplio rango de especies con sólo un mínimo de modificaciones (Tenover *et al.*, 1997).

En la actualidad, estas nuevas técnicas moleculares han permitido a los científicos disponer de una herramienta que brinda la posibilidad de profundizar hasta un nivel molecular, en las características propias de un organismo, tanto en el área de la medicina, como en de la investigación básica, con la finalidad de generar información que permita entender y finalmente controlar esas características. Sin duda la metodología disponible para la tipificación bacteriana aplicada al estudio comparativo de cepas relacionadas a ETAs, es cada vez más amplia y está en permanente proceso de cambios (Van Belkum *et al.*, 2001).

Los avances en la comprensión de las bases biológicas de la biodiversidad microbiana, a nivel de subespecies pueden mejorar el marco conceptual requerido para una apropiada interpretación epidemiológica de los resultados de tipificación.

Una adecuada y más amplia aplicación de estas técnicas, puede dar luz a la epidemiología de ETA's, permitiéndole tener un control más eficaz de estas, así como llevar a cabo mejores estrategias de prevención encaminadas a procurar la inocuidad y calidad de los productos de la industria alimenticia.

2.6. Compromiso de la industria alimenticia, con el consumidor sobre calidad e inocuidad de los productos listos para su consumo.

El mayor éxito de la industria alimenticia, es el reconocer que se requiere de un esfuerzo mutuo entre el cliente y fabricante. El cliente tiene que saber qué efectos tienen los alimentos para su salud y qué precio está obligado/dispuesto a pagar. Los productores saben que para ofrecer productos con calidad, requieren de materia primas de fuentes confiables, óptimas operaciones de procesamiento y métodos de almacenamiento y distribución adecuados, lo cual les amplía cada vez más, el complejo panorama de la oferta y demanda. Un fabricante comprometido con los consumidores, debe proveer un flujo continuo, de calidad y cantidad de producto al mercado.

Actualmente, la industria alimenticia, ha adquirido la conciencia de elaborar productos con aceptable calidad e inocuidad, posiblemente debido a exigencias que les bloquean la comercialización de su producto, a nivel nacional o internacional.

En la reducción de los riesgos de enfermedad asociados al consumo de productos cárnicos procesados deben implementarse acciones de tipo general, como una selección de materias primas con bajo contenido microbiano, curación rápida y completa, pH y Aw bajos en el producto final, aplicación de tratamientos térmicos (eficientes en relación tiempo/temperatura) en el producto final y uso de empaques herméticos desde antes del tratamiento térmico. Adicionalmente, evitar recontaminación postratamiento térmico, conservación de los productos a temperaturas permanentes menores a 3°C, tanto en el interior como fuera de la planta, y consumo preferente dentro de su periodo de caducidad. La implementación de un programa de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en ingles) esta plenamente indicado (FAO/WHO, 1996). En gran medida, estas acciones encaminadas a procurar la inocuidad del producto, en el caso de la producción de salchichas, podrian abatir también la incidencia de brotes de deterioro de origen microbiano del producto.

Los estudios en línea constituyen a la postre información básica indispensable como referencia para conocer la influencia de los tratamientos aplicados en cada etapa de la producción sobre la microbiología de cada producto, incluidas las prácticas de higienización del equipo. En cualquier caso, la calidad de las materias primas es fundamental. Enfoques modernos y estructurados del análisis de peligros, son enriquecidos por las metodologías de rastreo y tipificación que actualmente se utilizan en epidemiología (Buchanan *et al.*, 1996). Los modelos matemáticos de caracterización se aplican ordinariamente para predecir el potencial de desarrollo microbiano (deterioradores y patógenos) en el alimento, pero pueden y conviene extenderlos a los efectos de diferentes factores y combinaciones, en su supervivencia (Buchanan, 1993).

En este contexto, una empresa productora de salchicha, de capital mexicano, se aproximó al Laboratorio de Inocuidad Microbiana de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro, con la finalidad de obtener información y apoyo, sobre la implementación de medidas para proteger y mantener la calidad de su producto, el cual con anterioridad presentó problemas de deterioro por microorganismos. Claramente, la empresa tiene gran interés en probar nuevas opciones de mejoramiento y mantenimiento de la calidad e inocuidad de su producto terminado, una muestra de arrojo particularmente deseable y envidiable en cualquier industria alimenticia.

3. JUSTIFICACIÓN

Durante la elaboración de la salchicha se presentan oportunidades para que diversos microorganismos ingresen al alimento, con frecuencia estos provienen desde su materia prima. El desarrollo de microorganismos deterioradores en la salchicha compromete su calidad. *Leuconostoc* es uno de los responsables del deterioro de la salchicha. El deterioro genera pérdidas cuantiosas a los productores y comercializadores, así como el desprestigio de la marca productora. Para prevenir el deterioro es de vital importancia evitar la contaminación del alimento posterior al proceso de cocción. Para establecer medidas racionales para prevenir la contaminación es necesario conocer las fuentes y reservorios del germen deteriorador y realizar una higienización oportuna y eficiente de los equipos de producción que contactan directamente al alimento.

Es sabido que la capacidad de los microorganismos para adherirse e instalarse hasta conformar biopelículas en superficies inertes, aunados a la gran diversidad de respuestas ante factores de estrés, pueden comprometer la eficiencia de los tratamientos de desinfección que se emplean para su control.

Este trabajo se realizó atendiendo la solicitud de una empresa productora de salchicha, con el fin de abatir los eventos de deterioro de su producto. En estudios previos, nuestro grupo de investigación determinó el perfil microbiológico de las instalaciones y detectó la frecuente presencia de *Leuconostoc* spp en los equipos a lo largo de toda la línea de producción de la salchicha. También se identificó este género en el producto en proceso, terminado y deteriorado.

En este contexto, era imprescindible generar información sobre la existencia de reservorios de *Leuconostoc* spp. y su comportamiento en las superficies con las que trabaja la empresa. Esta información permitirá diseñar y verificar estrategias para la prevención y control de la persistencia de las cepas deterioradoras que se han aislado y posiblemente alojado en las instalaciones de la planta procesadora de salchichas, para así mejorar la estabilidad del producto durante su comercialización.

Adicionalmente, buscamos generar información respecto a la relación que pudiera existir entre la diversidad genética de las cepas de *Leuconostoc* aisladas de la empresa, con su capacidad de adhesión, colonización y formación de biopelículas en materiales empleados en los equipos de la línea de producción.

4. HIPÓTESIS

Cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de la empresa productora de salchichas poseen capacidad para generar biopelículas en superficies de acero inoxidable y polipropileno, y tal capacidad está asociada a su genotipo.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Investigar la diversidad genética y la capacidad para generar biopelículas de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de una empresa productora de salchicha.

5.2. Objetivos particulares

5.2.1. Tipificar mediante RAPD y PFGE cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de materiales y superficies de una planta procesadora de salchicha.

5.2.2. Determinar la capacidad de cepas de *Leuconostoc* spp. para adherirse, colonizar y formar biopelículas en superficies de polipropileno y acero inoxidable.

5.2.3. Investigar la asociación del genotipo con la capacidad de adhesión y los parámetros cinéticos de colonización de las cepas de *Leuconostoc* spp.

5.2.4. Evaluar la susceptibilidad de las cepas de *Leuconostoc* spp. con capacidad de formar biopelículas, a la acción de germicidas químicos.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

5.2.1. Equipos e instrumentos

- Agitador mecánico Vortex[®], Velp Scientifica[®], ns/113123
- Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge[®], Mod. 199-85
- Balanza analítica, sensibilidad 0.0001g Sartorius[®] y BL120S
- Balanza granataria, sensibilidad 0.1g OHAUS[®], Mod. CT200-S
- Baño maría con termostato, Arfrank[®], Mod. 91
- Biolog[®], MicroStation, Mod. 637
- Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial 25 x 35 cm
- Bolsa Whirl-Pak[®], Nasço[®], 10 x 22 cm
- Bolsa Ziploc[®], 15 x 15 cm
- Cámara Kodak[®], Edas[®] 290
- Campana de flujo laminar, Alder[®], Veco[®].
- Cuenta colonias, Quebec[®] Reicher-Jung[®]
- Equipo de electroforesis, BioRad[®], CHEF-DR-II[®]
- Espectrofotómetro de luz ultravioleta, ConRalex[®] Mod. 1252-B
- Fuente de poder para electroforesis Amercham Pharmacia Biotech[®] EPS 301
- Homogenizador Stomacher[®] Laboratory Blender[®], Mod. 400 (BA 7021)
- Horno para esterilización, Shel-lab[®]
- Incubadora con refrigeración (22, 30, 35°C), Preci ion Scientific[®]
- Micropipetas 1-1000 µl, Labsystems[®], Brand[®], Genex Beta[®], Rainin[®], Gilson[®]
- Microscópio óptico Axiostar plus[®], Mod. 1169-149
- Olla de presión Presto Steele[®], Mod. 21 Lts y 12 Lts
- Potenciómetro, Jenway[®], 3510 pH Meter[®]
- Refrigerador OSEDA[®] Refrigeración
- Refrigerador REVCO[®], Thermo Scientific[®]
- Termociclador Tech-gene[®], Mod. 512
- Transiluminador Hoeffler[®], Mod. 115VAC
- Ultracentrífuga Heraeus[®], Biofugue *pico*[®], Kendro[®]
- Microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany
- Material de uso común en el laboratorio de microbiología

5.2.2. Medios de cultivo

- Agar de Man-Rogosa-Sharp (MRS), Difco®
- Caldo infusión cerebro corazón (BHI), Difco®
- Caldo soya tripticaseína (CST), Difco®
- Caldo de Man-Rogosa-Sharp (MRS), Difco®
- Diluyente de peptona 0.1% (DP), Bacto®

5.2.3. Reactivos

- Ácido clorhídrico 5 y 20%
- Acetato de Sodio 3M
- Agarosa de bajo punto de fusión, BioRad®
- Agarosa Ultrapura, Invitrogen®
- Alcohol-cetona 1:1
- Alcohol etílico absoluto, Reactivos Monterrey®
- Alcohol Isoamílico, Reactivos Monterrey®
- Bromuro de etidio a 1 ppm
- Buffer de corrimiento 10x BlueJuice®, Invitrogen®
- Cacodilato de sodio
- Cloroformo
- Cristal violeta, Sigma®
- Duodecil Sulfato de Sodio, SDS, BioRad®
- EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, USB®
- Fenol
- Glicerol, Drogas la Paz®
- Glutaraldeido 3%
- Lugol, Reactivos Monterrey®
- Marcador de peso molecular, DNA ladder 50, 100 y 1000pb Invitrogen®
- Peróxido de hidrógeno, Zuum®
- Platinum PCR supermix, Invitrogen®
- Proteinasa K, Invitrogen®
- Púrpura de bromocresol
- Safranina, Sigma®
- Sarcosyl, BioRad®
- Tris-HCl, Sigma®

5.2.4. Material para modelo experimental

- Esferas de acero inoxidable (de 5/32 de pulgada, Importadora Guadalajara[®])
- Esferas de polipropileno con $0.35 \pm 0.04 \text{ cm}^2$ de área superficial, Sin Marca.

5.2.5. Material biológico

Cepas. Se emplearán 87 cepas del género *Leuconostoc*, aisladas en un estudio previo realizado por Cepeda-Marquez *et al.* (2009) a partir de materiales, equipos de producción, utensilios y producto en proceso y terminado de una empresa productora de salchicha (Cuadro 2).

Cuadro 2. Fuente y fecha de aislamiento de cepas de *Leuconostoc* spp. recuperadas dentro de una empresa productora de salchichas, empleadas en este estudio.

Cepa	Especie (Identificada mediante BioLog [®])	Fecha de Aislamiento	Fuente
2	<i>Leuconostoc plantarum</i>	28-Abr-08	Banda transversal que surte al cargador
5	<i>Leuconostoc lactis</i>	16-Jul-08	Pared de Banda de corte y pelado
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	16-Jul-08	Emulsión embutida
7	<i>Leuconostoc fallax</i>	16-Jul-08	Banda de corte y pelado
8	<i>Leuconostoc fallax</i>	16-Jul-08	Banda de corte y pelado
9	<i>Leuconostoc citreum</i>	16-Jul-08	Pared de Banda de corte y pelado
10	<i>Leuconostoc fallax</i>	16-Jul-08	Salmuera
11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	24-Dic-07	Salchicha marca "A" deteriorada
12	<i>Leuconostoc fallax</i>	27-May-08	Salchicha detenida en empaqueo
13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	-	Salchicha marca "B" deteriorada
14	<i>Leuconostoc fallax</i>	22-Abr-08	Banda de corte y pelado
15	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-May-08	Salchicha enfriada
16	<i>Leuconostoc fallax</i>	28-Abr-08	Cargador
18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	09-Abr-08	Restos de emulsión en tolva
19	<i>Leuconostoc fallax</i>	01-Ago-08	Emulsión embutida
20	<i>Leuconostoc lactis</i>	09-May-08	Salchicha marca "A" deteriorada
21	<i>Leuconostoc fallax</i>	28-Abr-08	Salchicha marca "A" deteriorada
22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	28-Abr-08	Salchicha marca "A" deteriorada
23	<i>Leuconostoc lactis</i>	28-Abr-08	Salchicha marca "A" deteriorada
24	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	28-Abr-08	Salchicha marca "A" deteriorada
25	<i>Leuconostoc lactis</i>	28-Abr-08	Salchicha marca "A" deteriorada
26	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	21-Ago-08	Emulsión embutida
27	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	21-Ago-08	Emulsión embutida
28	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	21-Ago-08	Tijeras en canjilones
29	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	13-Ago-08	Salchicha en horno
30	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Salchicha en horno
31	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Cubierta plastica de salchicha en horno
32	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	13-Ago-08	Cubierta plastica de salchicha en horno
33	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-Ago-08	Cubierta plastica de salchicha en el bote
34	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	13-Ago-08	Banda elevadora a zona de empaque
35	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-Ago-08	Banda elevadora a zona de empaque
36	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Banda elevadora a zona de empaque
37	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Banda transversal que surte al cargador
38	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Banda transversal que surte al cargador
39	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Banda transversal que surte al cargador
40	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-Ago-08	Cargador
41	<i>Leuconostoc plantarum</i>	13-Ago-08	Salchicha en empaque

42	<i>Leuconostoc plantarum</i>	13-Ago-08	Salchicha en empaque
43	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	13-Ago-08	Salchicha en empaque
44	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	13-Ago-08	Cargador
45	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Cargador
46	<i>Leuconostoc fallax</i>	08-Sep-08	Salchicha en empaque
47	<i>Leuconostoc fallax</i>	08-Sep-08	Salchicha en empaque
48	<i>Leuconostoc fallax</i>	08-Sep-08	Banda transversal que surte al cargador
50	<i>Leuconostoc fallax</i>	08-Sep-08	Mandil de operador
51	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	13-Ago-08	Salchicha en empaque
55	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Salchicha en horno
56	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Cubierta plastica de salchicha en horno
57	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-Ago-08	Cargador
58	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-Ago-08	Cargador
60	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-Ago-08	Banda transversal que surte al cargador
61	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	07-Oct-08	Salchicha en empaque
62	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	05-Nov-08	Emulsion embutida
63	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	05-Nov-08	Emulsion embutida
64	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	05-Nov-08	Emulsion embutida
67	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	21-Nov-08	Restos de salchicha en tambor de enfriamiento
68	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	21-Nov-08	Emulsión embutida
69	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	21-Nov-08	Emulsión embutida
70	<i>Leuconostoc fallax</i>	21-Nov-08	Emulsión embutida
73	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-Ago-08	Banda elevadora a zona de empaque
74	<i>Leuconostoc fallax</i>	13-Ago-08	Banda transversal que surte al cargador
75	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Banda transversal que surte al cargador
76	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Banda transversal que surte al cargador
77	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Cargador
78	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Cubierta plastica de salchicha retenidas en canjilones
79	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Cargador
80	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	13-Ago-08	Cargador
85	<i>Leuconostoc lactis</i>	18-Mar-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
88	<i>Leuconostoc lactis</i>	18-Mar-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
89	<i>Leuconostoc lactis</i>	18-Mar-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
91	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	18-Mar-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
92	<i>Leuconostoc lactis</i>	03-Feb-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
93	<i>Leuconostoc fallax</i>	03-Feb-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
95	<i>Leuconostoc fallax</i>	03-Feb-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
96	<i>Leuconostoc fallax</i>	03-Feb-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
98	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	02-Mar-10	Salchicha de pavo marca "D" deteriorada
99	<i>Leuconostoc lactis</i>	02-Mar-10	Salchicha de pavo marca "D" deteriorada
100	<i>Leuconostoc lactis</i>	02-Mar-10	Salchicha de pavo marca "D" deteriorada
101	<i>Leuconostoc lactis</i>	02-Mar-10	Salchicha de pavo marca "D" deteriorada
102	<i>Leuconostoc fallax</i>	02-Mar-10	Salchicha de pavo marca "D" deteriorada
105	<i>Leuconostoc fallax</i>	18-Mar-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
106	<i>Leuconostoc fallax</i>	03-Feb-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
108	<i>Leuconostoc lactis</i>	12-Abr-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
109	<i>Leuconostoc lactis</i>	12-Abr-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
110	<i>Leuconostoc lactis</i>	21-Abr-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
111	<i>Leuconostoc lactis</i>	21-Abr-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada
112	<i>Leuconostoc fallax</i>	21-Abr-10	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada

6.2. Métodos

6.2.1. Procedimientos generales

6.2.1.1. Preparación del inóculo

Las cepas previamente aisladas y conservadas en CST con 15% de glicerol en congelación, se reactivaron transfiriendo 40 μ L a un tubo con 5mL de caldo MRS, e incubaron a 30°C/24 h. Se realizaron tres transferencias sucesivas cada 24 h, y a las 18h de incubación del último cultivo se cosecharon las células mediante centrifugación (4500 x g, 15 min.). Los paquetes celulares fueron lavados dos veces, con solución salina fisiológica (SSF, 0.85% NaCl). El recuento viable de la suspensión bacteriana se realizó en agar MRS, mediante la técnica de extensión por superficie, tras una incubación de 48 h a 30°C.

6.2.1.2. Preparación de la suspensión de salchicha

Se preparó una solución al 5% p/v de salchicha en diluyente de peptona (DP). La mezcla salchicha-DP fue homogenizada durante dos minutos a alta velocidad en Stomacher[®] y esterilizada a 121°C por 15 min en calor húmedo. A partir de la suspensión estéril se prepararon diluciones para tener concentraciones menores (0.5 o 1%). Estas suspensiones se emplearon como vehículo de las bacterias en los ensayos de adhesión y colonización.

6.2.1.3. Obtención de las cepas de *Leuconostoc* spp. con resistencia a rifampicina

Cada cepa se activó en caldo MRS, durante 24 h a 30°C y se transfirió 40 μ L a caldo MRS con rifampicina (100ppm) y se incubó nuevamente por 24 h a 30°C. Finalmente, se sembraron mediante hisopo en cajas de agar MRS con rifampicina (150ppm). Las colonias que desarrollaron se aislaron y conservaron en CST adicionado con 15% de glicerol en refrigeración.

6.2.2. Genotipificación de las cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de materiales y superficies de una planta procesadora de salchicha, mediante RAPD y PFGE.

La diversidad genética de las cepas de *Leuconostoc* spp. fue evidenciada mediante genotipificación con la técnica de RAPD, identificando genotipos y grupos de estos en función a su similitud en el patrón de bandeo. Mediante la técnica de PFGE se confirmaron los genotipos que agrupaban dos o más cepas.

6.2.2.1. Tipificación de las cepas de *Leuconostoc spp.* mediante RAPD

Para cada cepa se obtuvo el paquete celular (6.2.1.1) y fue resuspendido en 450µL de buffer de Tris-HCl (50mM) (a 4 °C). Se agregó 11.25 µL de proteinasa K (20mg/mL) para una concentración final de 0.5mg/mL. Se mezcló suavemente y se mantuvo en reposo por 30 min. a 35°C. Se agregó 50 µL de SDS 10%, se homogenizó para después dejar reposar a temperatura ambiente por 10 min. Se agregó 500 µL de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 10,000 rpm/20 min. Se mezcló suavemente, obteniendo aprox. 500 µL de la fase acuosa. Se agregaron 50 µL de acetato de sodio 3M. Finalmente, el ADN fue lavado y recuperado mediante la adición de 1 mL de etanol absoluto frío (-20°C), mediante centrifugación a 10,000 rpm/20min y decantado. Repitiendo este último paso empleando 100 µL de Etanol 70% frío, se aplicó un lavado final en 40 µL de buffer TE (Tris-HCl 20 mM pH 7.6 y EDTA 1 mM).

El ADN de las cepas fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260nm (1 de absorbancia a 260 nm equivale a 50 ng/µL de DNA). Se verificó la pureza (≥ 1.8 abs 260/abs280nm) y la integridad mediante electroforesis empleando volúmenes de 100ng de ADN (0.8% agarosa/100mV/80mAmp/1.5h).

La tipificación de las cepas se realizó mediante el procedimiento de RAPD para *Leuconostoc spp.* productores de dextranos descrito por Scott *et al.* (1998), en el cual se realiza una amplificación por PCR, utilizando el iniciador 1299; las condiciones se describen en el Cuadro 3. Los productos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agar agarosa 2%, en buffer Tris-acetato-EDTA (TAE), durante 1.5h a 100mv y 80mAmp. Finalmente, fueron revelados los fragmentos de ADN, con bromuro de etidio (1ppm) y se visualizaron los patrones de bandas empleando un transiluminador de luz UV.

Cuadro 3. Iniciador aleatorio y condiciones de amplificación.

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Composición de la mezcla de reacción de PCR y condiciones de aplicación en PCR
1299	(AGCT)CC(AG)TC(CT)TG(ABGT)CC (AG)AA(AG)TA(AGCT)ACCCA	250µM de cada dNTP, 1.5 U de Taq ADN polimerasa, 0.25µg del iniciador y 1µg ADN molde. Desnaturalización inicial a 95°C por 1min, y 40 ciclos de PCR; cada uno a 94°C por 1min, alineamiento a 30°C por 1min y elongación a 72°C por 5min. Extención final a 72°C por 10min.

Fuente: Scott M. Holt., *et al.*, 1998.

6.2.2.2. Tipificación de las cepas de *Leuconostoc spp.* mediante PFGE

Se realizó la PFGE, de acuerdo a la metodología descrita por la CDC (Pulsnet, 2008), con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

La preparación del inóculo se siguió como se indica en el punto 6.2.1.1. Se realizaron los lavados celulares con SSF estéril y se resuspendieron cada cepa en buffer TE ajustando la cantidad de células hasta 1.3 ± 0.2 DO a 560 nm. Para la elaboración de los bloques de agar de bajo punto de fusión, se mezclaron 200µL de la suspensión celular ajustada y un volumen igual de agarosa (1.8%) de bajo punto de fusión a 37°C, agregando 15 µL de proteinasa K (20 µg/mL) y 1% SDS. La mezcla se colocó en el molde y se dejó gelificar a 10°C/10 min. Los bloques se colocaron en 1 mL de buffer de lisis (Tris-HCl (50 mM), proteinasa K (0.5 mg/mL), 1% SDS, 1% Sarcosyl). La lisis se llevó a cabo durante 2 h a 54°C en agitación constante. Se realizaron cuatro lavados: dos con agua destilada estéril y dos más con buffer TE (Tris-HCl 20 mM pH 7.6 y EDTA 1 mM). La restricción se llevó a cabo utilizando *ApaI* (20 µL de la solución 10X), incubando a 30°C durante 12 h. Finalmente, se separaron los fragmentos de restricción, mediante electroforesis en gel con campos pulsados (agarosa 1%, TBE 0.5X (Tris-borate-EDTA), 6V/cm, 14h, 14°C, pulso inicial: 4s y pulso final: 40s). El revelado del gel se realizó con bromuro de etidio (10 mg/mL) y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Se empleó un marcador de peso molecular de 1Kb como estándar en la electroforesis.

Análisis estadístico

Los perfiles de bandas obtenidos para cada cepa y cada técnica, fueron analizados de manera individual, empleando el coeficiente de correlación de Dice. (Tenover *et al.*, 1995 y 1997).

$$S_{ij} = \frac{2n_{ij}}{2n_{ij} + n_i + n_j}$$

Donde;
S_{ij}: Coeficiente de similitud
n_{ij}: Número de bandas que aparecen en los dos patrones
n: Número de bandas que solo aparecen en patrón *i* o *j*.

Se obtuvieron los porcentajes de similitud (*S_{ij}* *100) y se realizó un análisis en Cluster empleando la agrupación de pares sin peso con promedio matemático (UMPGA). Para generar dendrogramas de asociación genética se empleo el programa Statistica ver. 4.3 - 1993.

Se consideró un genotipo a las cepas con ≥95% (Kilic *et al.*, 2010).

6.2.3. Estudio de la capacidad de cepas de *Leuconostoc* spp. para adherirse, colonizar y formar biopelículas en superficies de polipropileno y acero inoxidable.

6.2.3.1. Efecto de la concentración de salchicha y tiempo de contacto sobre la adhesión de *Leuconostoc* a acero inoxidable y polipropileno.

Para establecer las condiciones necesarias para inducir la adhesión y colonización a las superficies de acero inoxidable y polipropileno fue necesario determinar la concentración de sólidos de salchicha y el tiempo de contacto suficiente para que las células se adhirieran sin un desarrollo significativo. Se empleó una mezcla de seis cepas de *Leuconostoc*, dos de cada especie: de *Lc. mesenteroides* las cepa 22 y 98, de *Lc. lactis* la 20 y 85 y de *Lc. fallax* la 46 y 93. Las células activadas y lavadas (10⁴ UFC/mL) se suspendieron en 0.5, 1, 3, 5, 10 y 20% (p/v) de salchicha en diluyente de peptona. Y se almacenaron a 30°C. Periódicamente se cuantificaron las células viables en agar MRS.

Para determinar el tiempo necesario para la adhesión, se empleó una suspensión de salchicha de 0.5% que contenía 10⁴ UFC/mL de *Leuconostoc*. En esta suspensión se depositaron dos esferas de acero inoxidable (5/32 pulg. de diámetro) o tres esferas de polipropileno (0.35 cm² de área superficial) y se incubaron durante 1, 2, 4, 6, 8 y 12h a 30°C. Periódicamente las esferas se lavaron con SSF estéril y finalmente, las células adheridas se removieron mediante Vortex® (3,000 rpm/2min) y se cuantificaron en agar MRS (48h/30°C). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

6.2.3.2. Evaluación de la capacidad de las cepas para formar biopelículas

Con los resultados de los experimentos anteriores se logró establecer un protocolo (Figura 3) para promoción de la biopelícula, que permitiría evaluar la capacidad de cada cepa para adherirse y colonizar las superficies de los equipos de producción. Cada cepa de *Leuconostoc* spp., aislada de la empresa productora de salchichas, de forma individual se evaluó por triplicado empleando este procedimiento.

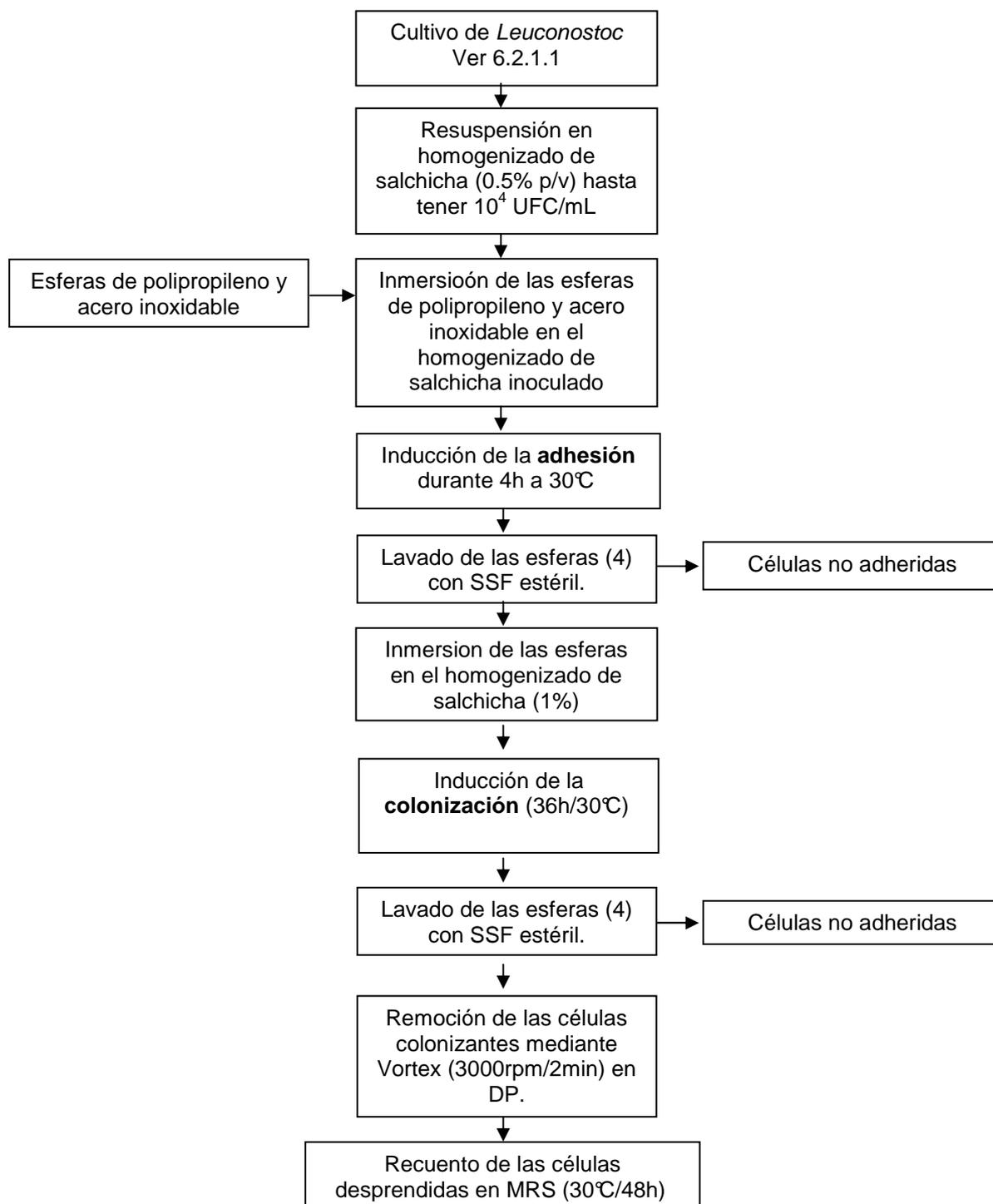


Figura 3. Diagrama general de inducción de la adhesión y colonización de *Leuconostoc* en esferas de polipropileno y de acero inoxidable.

Se cuantificó la adhesión de las cepas a la superficie de acero inoxidable y polipropileno, al inicio del proceso de colonización.

Porcentaje de adhesión= [(celulas que lograron permanecer en las esferas tras los cuatro lavados con SSF/Total de celulas inóculadas en la suspensión)*100].

En ambos materiales y para cada cepa se generaron curvas de desarrollo, realizando recuentos a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48h, como se describe en la Figura 3. El estudio se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Una vez elaboradas las curvas de desarrollo, el comportamiento de cada cepa en cada material se modeló matemáticamente mediante la ecuación de Gompertz y de Baranyi, empleando el programa DMfit (www.combase.cc). Posteriormente se eligió con ayuda de una correlación de Pearson y un análisis de residuales, el modelo que mejor se ajustaba al comportamiento observado.

Del modelado de cada curva de desarrollo se obtuvieron tres parámetros cinéticos:

- Duración de la fase Lag (h)
- Velocidad máxima alcanzada (Log de UFC/h/cm²)
- Población máxima alcanzada (Log de UFC/cm²)

Parámetros que fueron empleados para comparar el comportamiento entre cepas y materiales, mediante ANOVA y Tuckey en el paquete estadístico JMP 5.1.1.

6.2.3.3. Confirmación de la formación de la biopelículas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para confirmar la adhesión y formación de biopelículas de las cepas de *Leuconostoc* spp. a las superficies, se empleó MEB. Las esferas de polipropileno y placas de acero inoxidable (círculos de 12 mm de diámetro) se prepararon, de acuerdo al método descrito por Getz *et al.* (1983), con algunas modificaciones realizadas por Hernández-Iturriaga (2003).

Las placas con las células adheridas, en colonización o biopelícula se fijaron durante 2 h en glutaraldehído (3%), seguido de 2 h en tetraóxido de osmio (1%), ambos reactivos preparados en una solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.36). Las placas con las películas fijadas, se deshidrataron en un gradiente de soluciones de alcohol etílico (10, 25, 50, 75 y 100%) a 4°C. Se secaron en un desecador de punto crítico, debiéndose montar en un portamuestras y se

recubrieron con oro. Finalmente se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950 operado a 10kV, provisto y operado por el laboratorio de Limnología y Ecología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las micrografías se analizaron acuciosamente, con la finalidad de observar formaciones tridimensionales de aglomerados celulares.

6.2.4. Asociación del genotipo con la capacidad de adhesión y los parámetros cinéticos de colonización de las cepas de *Leuconostoc* spp.

Empleando los dendrogramas de asociación genética, se compararon los grupos ahí formados con los dendrogramas de respuestas para cada parámetro cinético.

Se identificaron grupos de cepas con similar comportamiento, que fueron asociadas con patrón similar de bandeo mediante RAPD.

6.2.5. Evaluación de la susceptibilidad a germicidas químicos, de las cepas de *Leuconostoc spp.* con capacidad de formar biopelículas.

En esta etapa se pretendía evaluar tres efectos:

6.2.5.1. Efecto de sales cuaternarias de amonio, ácido peroxiacético, cloro y agua electrolizada neutra, sobre biopelículas de *Leuconostoc spp.* en acero inoxidable y polipropileno.

Para esta evaluación se emplearon sales cuaternarias de amonio (150ppm), ácido peroxiacético (80ppm), cloro (200ppm) y agua electrolizada neutra (AEN) (428ppmCl⁻, 1086mVEh, pH7.2). Para realizar este experimento era necesario que antes conociéramos si las células de *Leuconostoc* inmersas en la biopelícula podrían seguir viables por varios días. Para ello, se promovió la adhesión y colonización como se describe en la sección 6.2.3.1, para tres cepas de cada especie (*Lc. mesenteroides*: 98, 22, 44; *Lc. lactis*: 101, 85, 20; *Lc. fallax*: 46, 93, 105; y *Lc. plantarum*: 2, 41, 42) marcadas con resistencia a rifampicina (150ppm). Se monitoreó la población viable en la biopelícula mediante recuento en agar MRS con rifampicina (150 ppm) cada día hasta un total de ocho. Con este experimento, se identificó el día en que la biopelícula ya no cambia su número de población total.

Se emplearon mezclas de cepas por especie (ver Cuadro 11), seleccionadas por presentar un predominante potencial para adherirse y colonizar, para generar biopelículas de *Leuconostoc* como se describe en la Figura 3, sobre esferas de cada material. La biopelícula fue lavada con SSF estéril (para remover las células que no quedaron inmersas en la biopelícula). Las esferas colonizadas se expusieron a los germicidas por inmersión en 500 µL. Los tiempos de exposición para cada germicida se señalan en el Cuadro 4, establecidos de acuerdo a la recomendación del proveedor. Una vez aplicado el tratamiento, se agregó 500 µL de caldo neutralizante para detener el efecto del germicida. Se realizaron las diluciones necesarias en DP y el recuento de sobrevivientes se realizó en agar MRS con 100 ppm de rifampicina.

Cuadro 4. Tratamientos germicidas y su tiempo de aplicación.

Tratamiento	Tiempo de exposición (min.)
Sales Cuaternarias de Amonio (150ppm)	10
Ácido peroxiacético (80ppm)	2
Cloro (200ppm)	10
Agua Electrolizada Neutra (428ppmCl ⁻ /1086mV Eh)	5
Control negativo (sin germicida)	-
Control de arrastre (solo DP 0.1%)	10, 5 y 2*

* Simulando un agente no germicida, según el tiempo de aplicación de los germicidas a probar.

6.2.5.2. Efecto del AEN, sobre los genotipos críticos de *Leuconostoc* spp.

Una vez identificado el germicida que mostró mayor reducción logarítmica de *Leuconostoc* en biopelícula sobre los dos materiales, se procedió a observar su efecto sobre las cepas que integran los genotipos “críticos” en cada especie. Se definió como cepas con un perfil fenotípico crítico a aquellas que presentan la mayor capacidad de adhesión (>6% adhesión), inician con mayor rapidez la colonización [Lag] (<5h), colonizan con mayor velocidad (>0.6 LogUFC/cm²/h) y alcanzan una mayor población en la superficie (>5 Log UFC/cm²). Si el genotipo estaba integrado de dos o más cepas se evaluaron las cepas por separado y en grupo. Nuestro objetivo fue observar la diversidad de respuestas de las cepas que integran un genotipo.

En este experimento se emplearon los genotipos identificados como “críticos” según su potencial para adhesión y colonización.

6.2.5.3. Efecto de la etapa de formación de la biopelícula de *Leuconostoc* sobre la eficiencia de AEN

Empleando el genotipo III de *Leuconostoc lactis* (seleccionado según su potencial para formar biopelículas), se evaluó el efecto del AEN a lo largo de la colonización (Cuadro 5).

Cuadro 5. Definición de las etapas de la biopelícula.

Depósito	Células inoculadas sobre la superficie de la esfera de cada material, que fueron secadas durante 90 min ± 15 min. en un flujo laminar.
Adhesión	Células que lograron adherirse a las esferas de cada material después de una exposición de 4 horas en una suspensión de salchicha 0.5%.
Colonización	Células en desarrollo adheridas a la superficie de las esferas inmersas en una suspensión de 1% de salchicha. Fue monitoreada a los 2 días de iniciada la colonización.
Biopelícula	Biopelícula con al menos 72 h después de iniciada la colonización de la superficie.

En este experimento así como en los anteriores, también fue incluido un control solo con diluyente de peptona (0.1%) con la finalidad de observar el efecto del arrastre (ver condiciones de aplicación: Cuadro 4).

La recuperación de las células sobrevivientes al tratamiento se realizó mediante remoción en Vortex® a 3,000rpm durante 2 min, en 500µL de caldo neutralizante (Savitri-Vatanyoopaisarn, 1998). Se inocularon placas de agar MRS adicionado con 150ppm de rifampicina por extensión en superficie y se incubaron a 30°C por 24-48h.

Adicionalmente, con la finalidad de observar el efecto del AEN sobre las células en colonización, las esferas tratadas se fotografiaron mediante MEB, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.2.3.3.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias empleando la prueba de Tukey, en el paquete estadístico JMP 5.0.1.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Diversidad genética de las cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de una empresa productora de salchichas

La diversidad es generada como resultado de la adaptación de un microorganismo al medio ambiente, a través de mutaciones y el reordenamiento de los genes dentro del genoma y/o la adquisición de genes por proceso de transferencia horizontal, mediante plásmidos, bacteriófagos, transposones o integrones (Danielle *et al.*, 2006). Una mayor diversidad genética sugiere que las cepas presentes en un ambiente pueden mostrar diferentes respuestas a los factores ambientales adversos (Danielle *et al.*, 2006). Estas respuestas se tornan importantes cuando el objetivo es inactivar la bacteria en un entorno de producción.

Empleando el protocolo de RAPD para la tipificación de cepas de *Leuconostoc* spp. se identificaron diferencias entre los perfiles genéticos de cada especie (Figura 4).

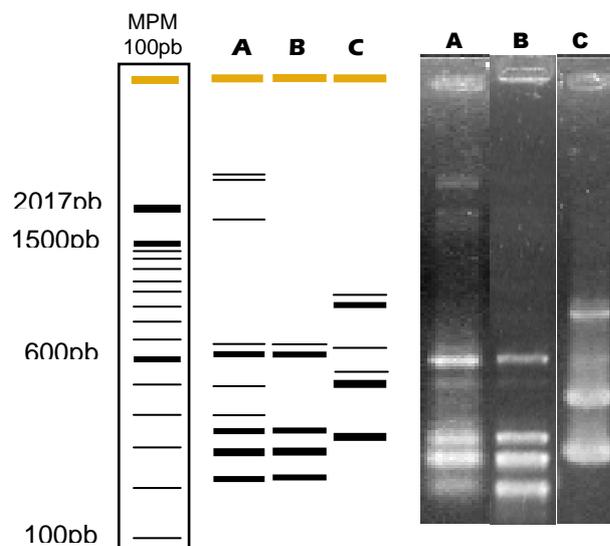


Figura 4. Perfiles genéticos por especie.
A: *Lc. mesenteroides*, B: *Lc. fallax*, C: *Lc. lactis*

Las cepas de *Lc. lactis* tienen diferente patrón genético (0% de similitud) que el de las cepas de otras especies. Por el contrario, se observa por lo menos un 32% de similitud genética entre las cepas de la especie *Lc. mesenteroides* y *Lc. fallax*.

Dado que las cepas dentro de cada especie presentaron un número variable de bandas, también es posible identificar diferencias entre las cepas (Figura 5).

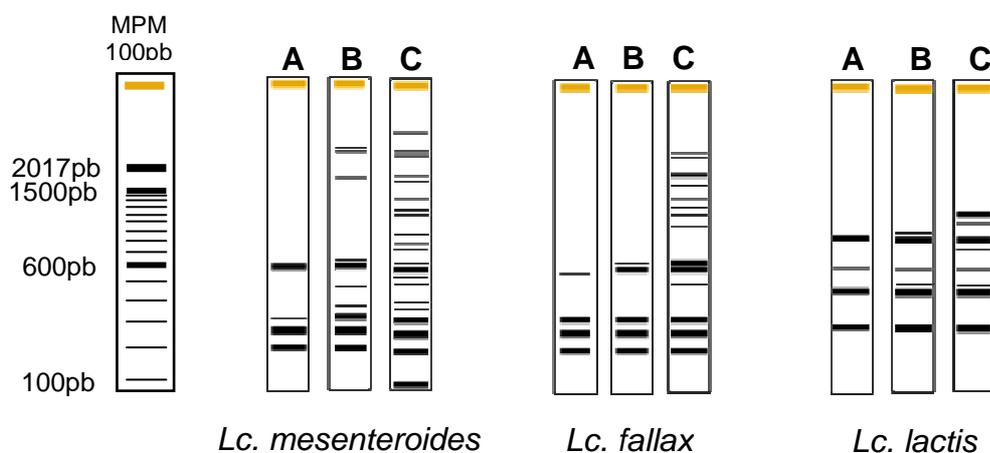


Figura 5. Perfiles genéticos según especie de *Leuconostoc*: **A.** patrón de bandas conservadas por especie; **B.** perfil observado con mayor frecuencia; **C.** patrón con más bandas.

Las Figuras 6a, 6b, 6c y 6d muestran los dendrogramas de la relación genética de las cepas de cada especie de *Leuconostoc*.

Se identificaron 37 genotipos de la especie *Lc. mesenteroides*, 23 de *Lc. fallax*, seis de *Lc. lactis*, dos de *Lc. plantarum* y uno de *Lc. citreum*.

A pesar de que *Lc. mesenteroides* muestran el mayor número de genotipos, la mayoría de sus cepas (62%) muestran una estrecha relación entre ellos ($\geq 55\%$ de similitud). Se puede observar en el primer dendrograma un grupo de ocho cepas (marcado con el recuadro verde), aislado a partir de materias primas, superficies a lo largo del proceso de producción y producto en deterioro, con más de 70% de similitud genética. Algunas cepas aisladas en abril y en el periodo de agosto a noviembre del 2008 (caja azul) mostraron diferentes perfiles genéticos (11% de similitud) en comparación con las otras cepas.

Algunos genotipos de *Leuconostoc* asociados con más del 80% de similitud genética mostraron persistencia en el tiempo. Este es el caso de cepas de *Lc. mesenteroides*, aisladas de salchichas en deterioro en diciembre de 2007 y en abril de 2008 (rojo), sin embargo, es preciso aclarar que no pertenecen al mismo genotipo.

Dos grupos diferentes de los genotipos de *Lc. fallax* se identificaron con $\geq 50\%$ de similitud genética (Figura 6b). Cada grupo relaciona diferentes intervalos de muestreo específicos (abril a agosto y de agosto a noviembre de 2008). Algunas cepas de *Lc. fallax*, aisladas de producto en proceso y de equipo (morado), podrían agruparse en dos genotipos (XVII y XVIII), mientras que las cepas aisladas de

salchicha deteriorada de tres lotes diferentes elaborados en el año 2010 (amarillo) se asociaron con el genotipo X.

Lc. lactis mostró menor número de genotipos (seis), en comparación con las otras especies. El tercer dendrograma (Figura 6c) muestra tres genotipos de interés. El genotipo V con 100% similitud entre las cepas aisladas de cinco eventos de deterioro entre febrero y abril de 2010 (rosa). El genotipo III está compuesto de las cepas aisladas de producto deteriorado con fecha de aislamiento de hasta dos años de diferencia (naranja). El genotipo I, relaciona dos cepas (100% similitud genética), que fueron aisladas de producto deteriorado y una superficie de banda transportadora (tinto).

Lc. plantarum sólo mostró dos genotipos, relacionados entre si con más del 60% de similitud genética (Figura 6d).

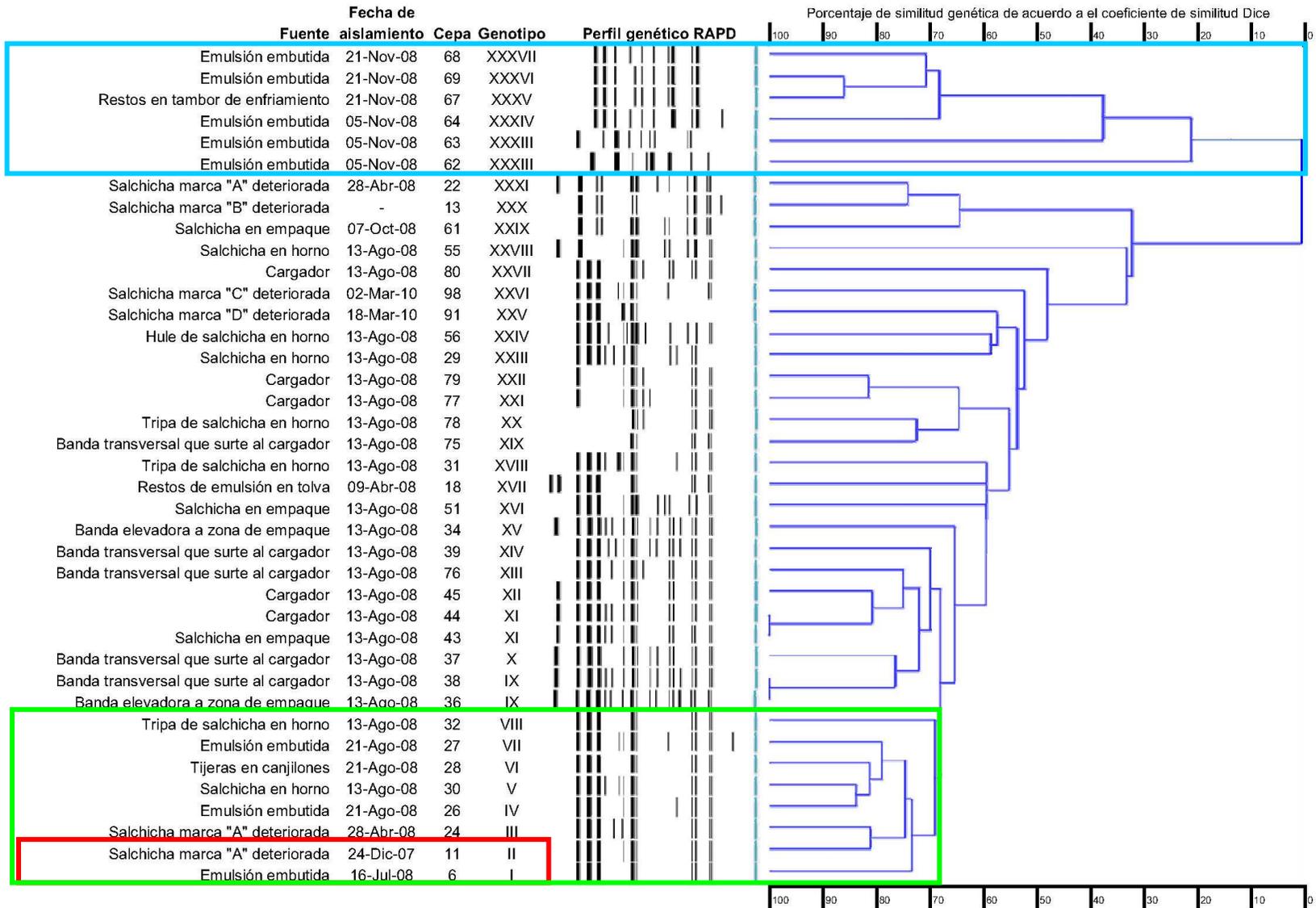


Figura 6a. Dendrograma de RAPD para la relación genética de las cepas de *Leuconostoc mesenteroides*.

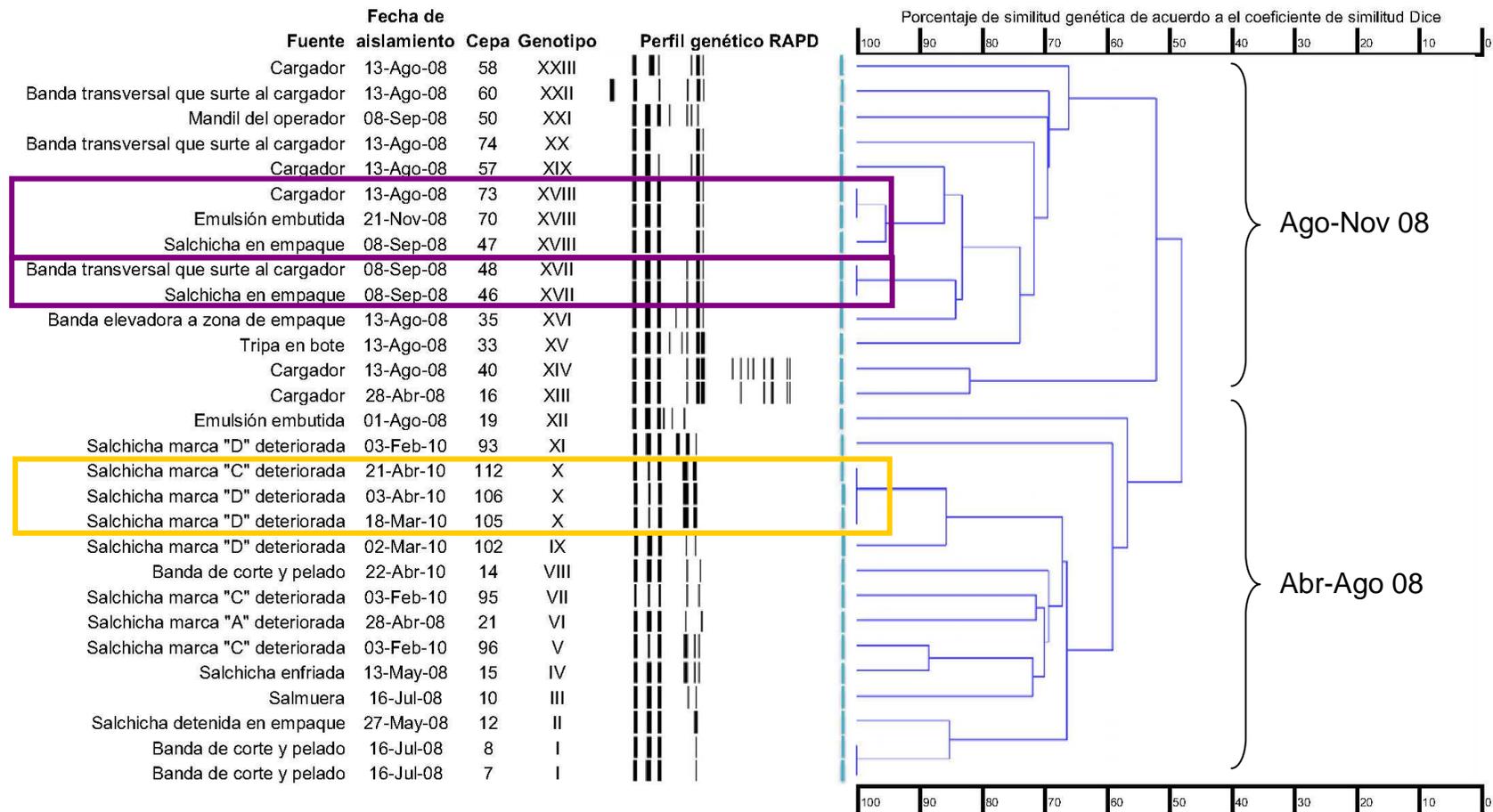


Figura 6b. Dendrograma de RAPD para la relación genética de las cepas de *Leuconostoc fallax*.

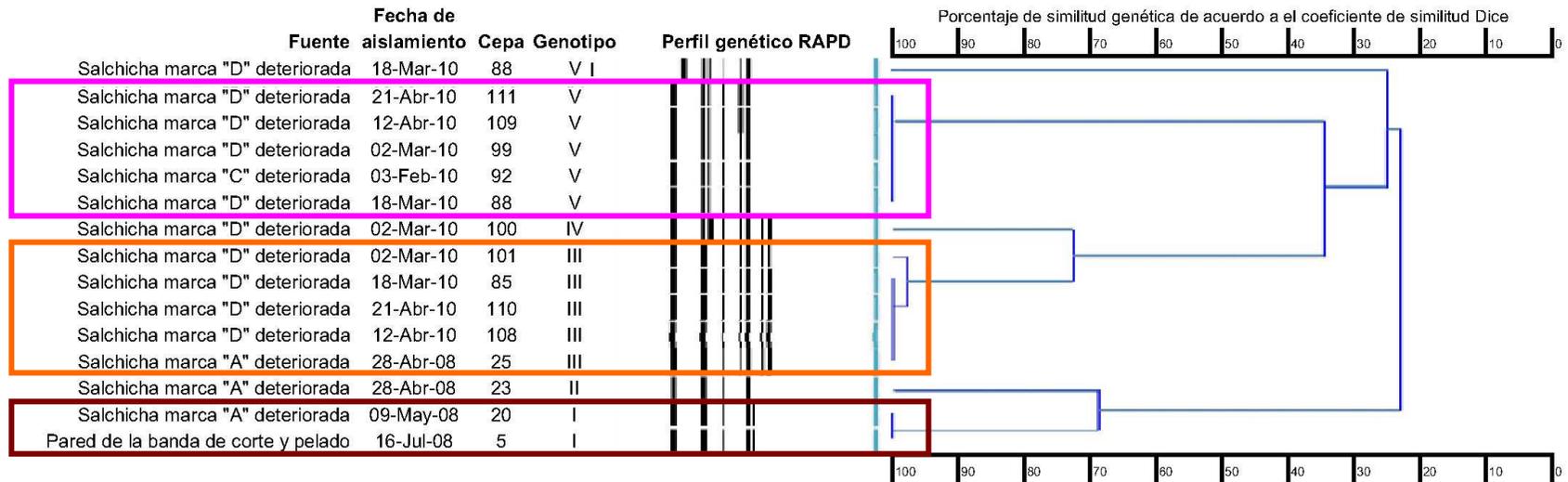


Figura 6c. Dendrograma de RAPD para la relación genética de las cepas de *Leuconostoc lactis*.

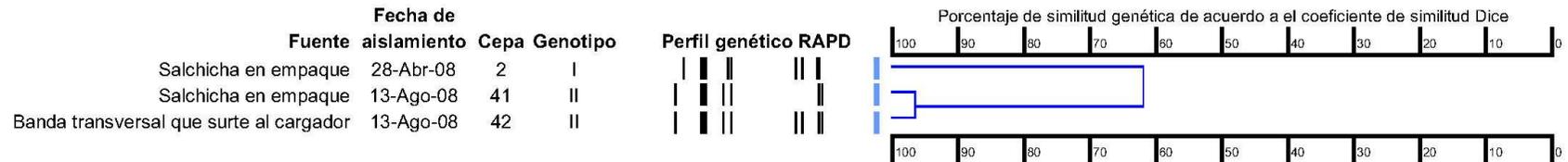


Figura 6d. Dendrograma de RAPD para la relación genética de las cepas de *Leuconostoc plantarum*.

La diversidad genética de 87 cepas de *Leuconostoc* de una empresa productora de salchichas se investigó mediante RAPD. Este método resultó ser rápido y sensible, como ha sido reportado por otros autores (Scott *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2002; Ben-Amor *et al.*, 2007). La técnica de RAPD ofrece ventajas como un menor costo, rapidez y sencillez en su realización con respecto a otras técnicas de tipificación (Struelens *et al.*, 1996).

Lc. mesenteroides, *Lc. lactis* y *Lc. fallax*, fueron las tres especies que con mayor frecuencia fueron aisladas del entorno de procesamiento de las salchichas. Las especies que predominan en las superficies de los equipos, utensilios y salchichas en el proceso fueron *Lc. mesenteroides*, *Lc. fallax*, *Lc. plantarum* y *Lc. citreum*. *Lc. lactis*, fue la especie predominante de salchichas en deterioro, coincidentemente con lo reportado por Yost y Nattress (2002) para salchicha tipo Viena empacada al vacío. *Lc. lactis* muestra menor diversidad genética según el número de genotipos identificados y el número de cepas estudiadas.

7.1.1. Reservorios y rutas de contaminación por *Leuconostoc* spp. en la planta procesadora de salchicha.

Mediante el método de RAPD se identificaron cepas con huella genética “similar” o “indistinguible” de diferentes fuentes, que conformaron un genotipo. Las cepas que pertenecían a un mismo genotipo se confirmaron mediante PFGE, incluyendo en cada gel, una cepa que con anterioridad ya se había procesado con la misma endonucleasa, con la finalidad de verificar la reproducibilidad y efectividad de la restricción. En el Cuadro 6 se muestran una comparación entre los porcentajes de asociación genética (Dice) obtenida mediante la técnica de RAPD y PFGE para cada genotipo. Con estos resultados fue posible identificar reservorios/fuentes de segregación microbiana continua o discontinua a través del tiempo, además de trazar posibles rutas de contaminación a lo largo de la línea de producción de la salchicha.

Cuadro 6. Comparación entre los porcentajes de asociación genética (Dice) obtenida mediante la técnica de RAPD y PFGE para cada genotipo.

Especie (Número de Genotipos)	Genotipo	Porcentaje de similitud (Dice)	
		RAPD*	PFGE**
<i>Lc. mesenteroides</i> (41)	IX	100.0	99.1
	XI	100.0	100.0
<i>Lc. fallax</i> (23)	I	100.0	100.0
	X	100.0	100.0
	XVII	100.0	100.0
	XVIII	95.2	99.1
<i>Lc. lactis</i> (6)	I	100.0	100.0
	III	98.4	100.0
	V	100.0	100.0
<i>Lc. plantarum</i> (2)	I	96.5	100.0

*5% de tolerancia debido a posición y tamaño de bandas en el gel; ** 1% de tolerancia.

En los Cuadros 7, 8 y 9 se muestran los genotipos que fueron confirmados mediante PFGE y que tienen relevancia para la identificación de fuentes y mecanismos de contaminación, según especie.

Cuadro 7. Genotipos de interés encontrados en las cepas de *Lc. mesenteroides*.

Especie (Número de Genotipos)	Genotipo	Fuente	Fecha*
<i>Lc. mesenteroides</i> (41)	IX	Cargador	13-Agosto-2008
		Salchicha en empaque	13-Agosto-2008
	XI	Banda elevadora a zona de empaque	13-Agosto-2008
		Banda transversal que surte al cargador	13-Agosto-2008

* Fecha de aislamiento

Cuadro 8. Genotipos de interés encontrados en las cepas de *Lc. fallax*.

Especie (Número de Genotipos)	Genotipo	Fuente	Fecha*
<i>Lc. fallax</i> (23)	I	Pared de Banda de corte y pelado	16-Julio-2008
		Pared de Banda de corte y pelado	16-Julio-2008
	X	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	3-Febrero-2010
		Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	21-Abril-2010
		Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	18-Marzo-2010
		Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	18-Marzo-2010

XVII	Banda transversal que surte al cargador	8-Sep-2008
	Salchicha en empaque	8-Sep-2008
XVIII	Cargador	13-Agosto-2008
	Salchicha en empaque	8-Sep-2008
	Emulsión embutida	21-Nov-2008

* Fecha de aislamiento o de elaboración en el caso de producto deteriorado

Cuadro 9. Genotipos de interes encontrados en la cepas de *Lc. lactis*.

Especie (Número de Genotipos)	Genotipo	Fuente	Fecha*	
<i>Lc. lactis</i> (6)	I	Salchicha marca "A" deteriorada	9-Mayo-2008	
		Pared de Banda de corte y pelado	16-Julio-2008	
	III	Salchicha de pavo marca "D" deteriorada	2-Marzo-2010	
		Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	18-Marzo-2010	
		Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	12-Abril-2010	
		Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	21-Abril-2010	
		Salchicha marca "A" deteriorada	28-Abril-2008	
		V	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	21-Abril-2010
			Salchicha de pavo marca "C" deteriorada	12-Abril-2010
	Salchicha de pavo marca "D" deteriorada		2-Marzo-2010	
	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada		3-Febrero-2010	
	Salchicha de pavo marca "C" deteriorada		18-Marzo-2010	

* Fecha de aislamiento o de elaboración en el caso de producto deteriorado

Diversos genotipos evidencian una estrecha relación entre las cepas aisladas de diversas superficies del equipo con el producto empaçado, en el mismo muestreo. Tal es el caso del genotipo IX de *Lc. mesenteroides* y el XVII de *Lc. fallax*. Así mismo, el genotipo XVIII de *Lc. fallax*, además de relacionar al equipo con producto empaçado, también se encontró en la emulsión embutida, en el periodo comprendido de agosto a noviembre del 2008.

El genotipo XI de *Lc. mesenteroides* relaciona a dos superficies consecutivas en el proceso. Es comprensible esta asociación dado que la banda elevadora alimenta

de producto a la banda transversal que a su vez surte al cargador que acomoda las salchichas en su empaque.

Los genotipos X de *Lc. fallax* y V de *Lc. lactis* asocian tres y cinco eventos de deterioro de producto, respectivamente, elaborados en lotes distintos a inicio del año 2010. En cambio, el genotipo III de *Lc. lactis* asocia a cinco eventos de deterioro ocurridos a inicios del año 2010, con un evento ocurrido dos años atrás, en abril del 2008. Este hecho sugiere una permanencia del deteriorador en el proceso de fabricación de la salchicha o el continuo ingreso de este a través de la materia prima.

Es posible elucidar que algunas cepas de *Leuconostoc* hayan persistido en el proceso de producción por varios años, posiblemente se deba a que los procedimientos sanitarios aplicados en los equipos y las superficies de las bandas transportadoras no son eficaces contra las cepas presentes en ellas. Las prácticas de saneamiento deficiente puede favorecer la selección de cepas con mayor resistencia a desinfectantes o con la capacidad de colonizar mejor las superficies de producción (Moretro *et al.*, 2003). La persistencia de la bacteria también sugiere la existencia de depósitos de *Leuconostoc* en el entorno de producción de salchichas.

7.2. Capacidad de las cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de una empresa productora de salchichas para adherirse y formar biopelículas en superficies de acero inoxidable y polipropileno.

En la naturaleza, muy pocos microorganismos prosperan de forma planctónica, la mayoría de los microorganismos lo hacen en grupos de aglomerados, que se adhieren a una superficie y permanecen conformando una biopelícula.

Las biopelículas son complejas comunidades de microorganismos viables y no viables rodeados por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) ancladas a una superficie (Carpentier *et al.*, 1993; Wimpenny *et al.*, 1993). En su estado maduro, una biopelícula constituye una estructura fascinante. Forma tapices, agregados, promontorios o incluso microcolonias de mayor complejidad que generan formaciones con aspecto de “tallo o champiñón” (Ruiz *et al.*, 2008). Los habitantes de la película pueden pertenecer a una misma especie o a diversos grupos de microorganismos. Su nexo común es una matriz de polisacáridos (SPE), ADN y proteínas, formando una interfase adherente en donde las bacterias quedan atrapadas, previniendo la desecación, el acceso de antimicrobianos, secuestrando metales y toxinas (Carpentier *et al.*, 1993; Costerton *et al.*, 1981; Harrison *et al.*, 2006; Sutherland *et al.*, 1983).

Debido a su complejidad la formación incluye el depósito, adhesión, colonización de la superficie y formación de EPS hasta su maduración (Frank y Zhu, 2008). Las biopelículas, en la industria de alimentos, se generan por una incorrecta higienización, debido a la acumulación de materia orgánica y la presencia de agua libre en la superficie (Boulangé-Peterman *et al.*, 1993).

La permanencia de cepas de *Leuconostoc* spp. en el equipo de producción de la empresa productora de salchichas y la estrecha relación genética encontrada entre las cepas aisladas de producto deteriorado de diversos lotes y equipo de producción, sugieren que estas cepas pueden tener capacidad para formar biopelículas sobre acero inoxidable y polipropileno, materiales con que están elaborados los equipos de la línea de producción.

7.2.1. Adhesión *Leuconostoc* spp. a superficies de acero inoxidable y polipropileno, empleando sólidos de salchicha como vehículo de promoción.

La adhesión de las bacterias a una superficie ocurre mediante diversos mecanismos: I) interacciones electrostáticas: como lo sugieren Mafu *et al.* (1991) y Barbara-Vu *et al.* (2009) sobre acero inoxidable, vidrio, hule y polipropileno, II) interacciones hidrofóbicas: sobre gotas de lípidos, membranas celulares y cutículas de plantas (Vigeant y Ford, 1997), III) la producción SPE: polímeros que participan en varias funciones celulares como la protección de la bacteria ante condiciones de estrés ambiental, acumulación de nutrientes, patogénesis, simbiosis y fenómenos de adhesión y colonización a superficies sólidas (Consternon *et al.*, 1987; Waters *et al.*, 2005), Vandervivere y Kirchman (1993) sugieren además que las superficies sólidas estimulan a las células adheridas a la síntesis de material extracelular, esto mediado por percepción en quórum (QS, por sus siglas en inglés quórum sensing) (Waters *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 1998) y finalmente IV) la presencia de flagelos, pilis o fimbrias en la superficie bacteriana que también participan en el proceso de adhesión a superficies (Matthysse, 1992; Vatanyoopaisarn, 2000), entre otros.

Para estudiar el fenómeno de adhesión a superficies inertes se recurre a modelos de laboratorios. Estos consisten en inocular un número conocido de microorganismos usualmente a placas de superficie plana, propiciar adhesión mediante almacenamiento por un tiempo determinado, aplicar un enjuague con soluciones de sales o buffer de peptonas para eliminar células no adheridas y finalmente cuantificar la población remanente (Hernández-Iturriaga *et al.*, 2003).

Al emplear dichos modelos de laboratorio el criterio de adhesión se vuelve un tanto subjetivo. Es por ello que debe adoptarse una definición para cada estudio, ya que es dependiente del tipo de microorganismo empleado, sustrato, la naturaleza de la superficie inerte y las condiciones bajo las cuales se realiza el experimento.

Para fines prácticos en nuestro trabajo definimos a las “baterias adheridas” como aquellas células que permanecen en la superficie de acero inoxidable y/o polipropileno luego de aplicar una serie de cuatro enjuagues con solución salina fisiológica estéril, pero que pueden ser removidas en 500µL de DP, empleando un Vortex® a 3000 rpm. por 2 min. Estas condiciones fueron establecidas mediante ensayos descritos en el punto 6.2.3.1. Una concentración de 0.5% de salchicha en suspensión mantiene el número de *Leuconostoc*, sin promover el desarrollo durante

6h (Figura 7). Es decir, nos permite asociar el incremento en la adhesión con el aumento de células recuperadas y no con el incremento en la población como consecuencia del desarrollo (Figura 8). Además, se determinó que 4 h es el tiempo mínimo de contacto del inóculo con la superficie, suficiente para inducir la máxima adhesión y mantener el porcentaje (Figura 9). Así mismo, se identificó que cuatro lavados con SSF estéril son suficientes para remover y reducir las células no adheridas a la superficie, hasta un nivel no significativo (<0.001% de la población en adhesión). Una de las observaciones más sorprendentes en estos estudios fue la rapidez con la que se inicia el proceso de adhesión bacteriana sobre ambas superficies. Dentro de no más de 2 h de contacto con el inóculo, números elevados de células se asocian a estructuras hidrofílicas e hidrofóbicas como el acero inoxidable y polipropileno respectivamente.

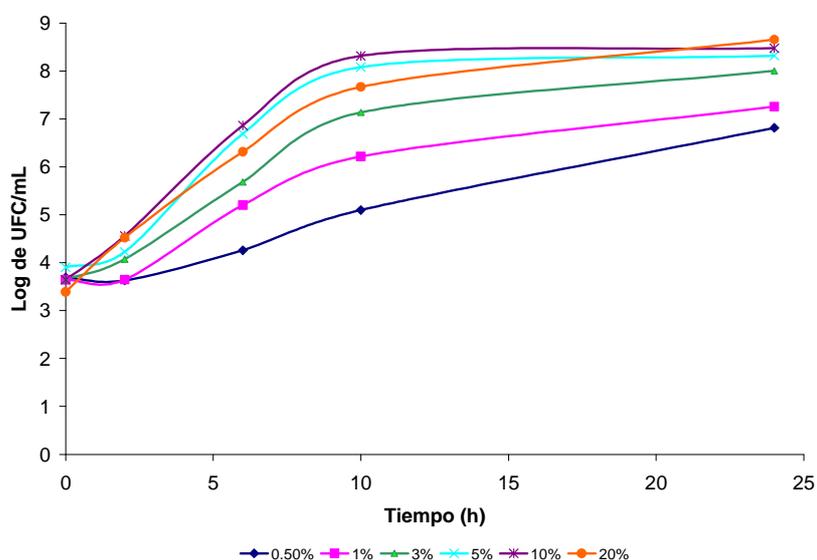


Figura 7. Desarrollo de *Leuconostoc* spp. en suspensión según concentración de salchicha.

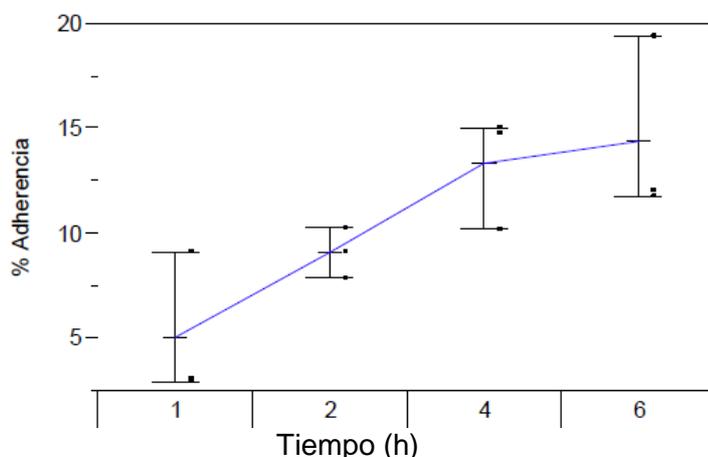


Figura 8. Porcentaje de adhesión de *Leuconostoc* spp. en suspensión de salchicha (0.5%p/v), a superficies de polipropileno.

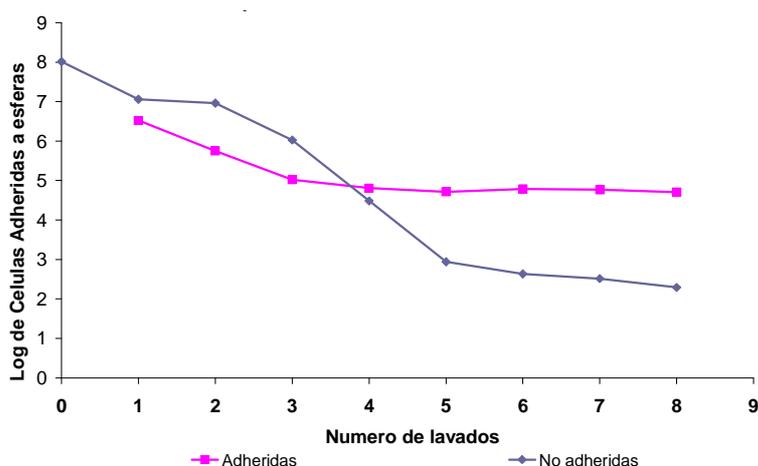


Figura 9. Permanencia de celulas adheridas y no a las esferas despues de varios lavados con SSF esteril.

El modelo que nosotros empleamos consistió en esferas de acero inoxidable de 5/32 pulgadas de diámetro y de polipropileno con $0.35 \pm 0.04 \text{ cm}^2$ de superficie, dadas las ventajas que este modelo supone sobre el modelo de placas (ver Cuadro 10).

Cuadro 10. Ventajas y desventajas del modelo de placas vs. el de esferas.

Modelo de placas	Modelo de esferas
<ul style="list-style-type: none"> - Pueden ser elaboradas mediante corte a partir de trozos de equipo o materiales de la misma empresa. - Presentan superficies irregulares modificadas por el corte en su elaboración. - La superficie de contacto entre placa-placa y/o placa-recipiente es grande. - El volumen de líquido para inmersión y enjuague es de 5 mL y 20 mL respectivamente (para una placa de 2.5x2.5x0.4 cm), por ende, supone mayor gasto de material y espacio para su almacenamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se adquieren del comercio como "Balines" acero inoxidable y "Pets" de polipropileno. - El total de la superficie presenta similar morfología ya que no supone un corte en su elaboración. - El punto plano donde pueden quedarse sólo depositadas las bacterias por acción de la gravedad es mínimo. - El punto de contacto entre esfera-esfera y/o esfera-recipiente es una superficie mínima. - El volumen de líquido para inmersión y enjuague es de 0.5 mL y 4 mL respectivamente (para 1 cm² de área superficial), y puede realizarse en tubos ependorff de 1.5 mL y almacenarse en una gradilla apropiada.

Sin embargo, fue necesario validar el modelo de esferas contra el de placas. Para ello se emplearon esferas adquiridas en el comercio local y placas de ambos materiales (2.5x2.5x0.4cm) elaboradas a partir de los restos de equipos y bandas de transporte de la empresa. El experimento se realizó por quintuplicado cuantificando el porcentaje de adhesión por centímetro cuadrado en ambos modelos. En este

experimento se empleó individualmente para cada especie una mezcla de dos cepas (de *Lc. mesenteroides* las cepa 22 y 98, de *Lc. lactis* la 20 y 85 y de *Lc. fallax* la 46 y 93).

Los resultados mostraron que no hay diferencia significativa entre modelos con ambos materiales ($P < 0.0032$ y $P < 0.0163$, para acero inoxidable y polipropileno respectivamente), es decir puede emplearse con éxito el modelo de esferas para evaluar la adhesión de células de *Leuconostoc*.

Una vez estandarizadas e identificadas las condiciones óptimas para estudiar la adhesión, se procedió a investigar la capacidad de adhesión a cada material, que muestran cada una de las cepas de *Leuconostoc* (87) aisladas de equipo, materiales y producto de la empresa productora de salchicha, en un periodo de tres años.

En primera instancia pudimos encontrar una gran diversidad de respuestas, ya que se observó que el 30.8% (28/91) de las cepas muestran mayor capacidad de adhesión a polipropileno que a acero inoxidable. Con valores que van desde 0.1-11.9% en polipropileno contra 0.0-1.8% de acero inoxidable (Figura 10).

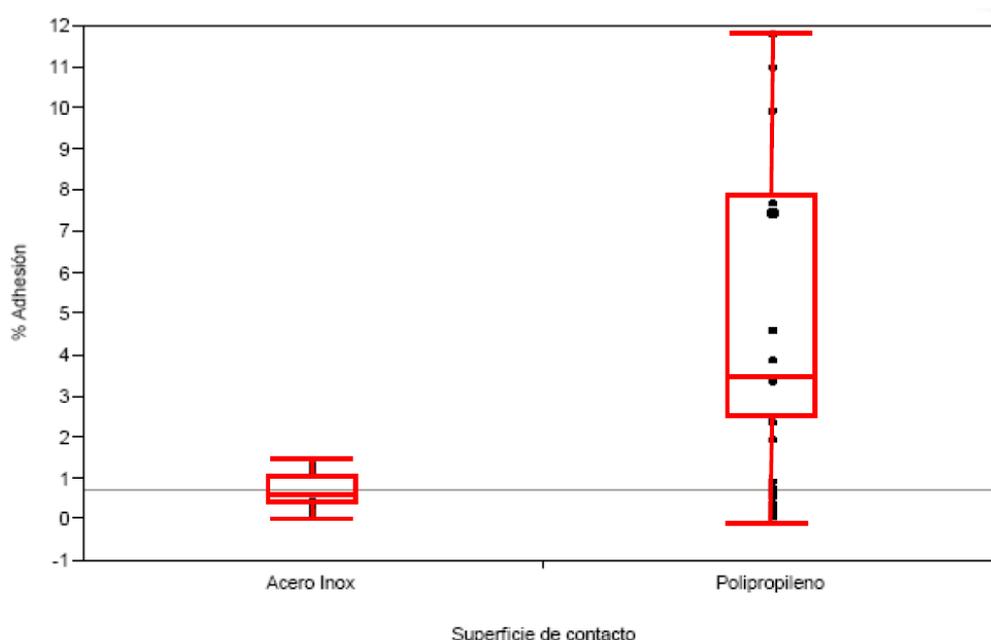


Figura 10. Adhesión de las cepas de *Leuconostoc* spp. según material de contacto.

Diversos autores muestran que algunos microorganismos tienen capacidad para adherirse a superficies inertes. Mafu *et al.* (1990) encontraron que *L. monocytogenes* se adhiere fácilmente a acero inoxidable, vidrio, polipropileno y hule, en tiempos no mayores a 20 min a 20°C o de 1 h a 4°C. Y mediante MEB,

evidenciaron la presencia de SPE después de 1h de promoción de la adhesión. Los autores concluyeron que las irregularidades en las superficies facilitan el atrapamiento de las bacterias y propician su adhesión. Posiblemente debido a esta característica es que el polipropileno retiene mayor número de células de *Leuconostoc* en adhesión, que el acero inoxidable.

De manera general, según material, las cepas parecen haber incrementado su potencial de adhesión de manera sustancial en los últimos tres años (Figura 11). Dado que las cepas aisladas en el año 2010 mostraron mayor capacidad de adhesión que las aisladas en el 2008 y 2007 (≤ 11.9 , ≤ 7.5 y $\leq 0.3\%$ respectivamente). Sin embargo, también este efecto puede estar asociado a que las cepas que tienen mayor tiempo desde su aislamiento han permanecido por mayor tiempo en conservación y que por tal motivo algunos autores sugieren pudieran perder dicha capacidad (Lillard, *et al.*, 1988; Liao y Sapers, 2000). También es posible observar la gran diversidad de respuestas de las cepas.

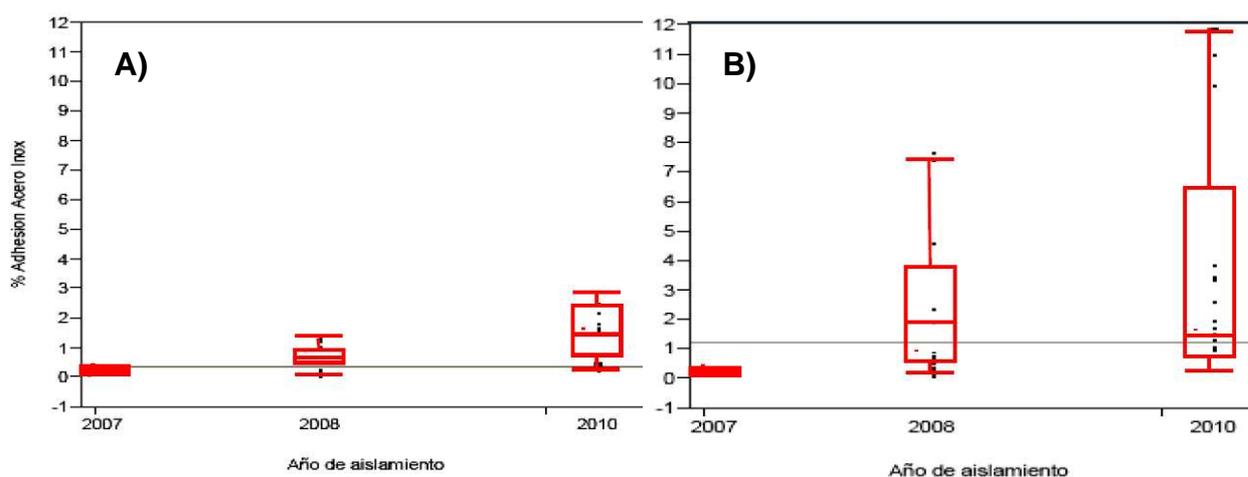


Figura 11. Adhesión de las cepas de *Leuconostoc* spp. según año de aislamiento y material de contacto: A) Acero inoxidable; B) Polipropileno.

Aparentemente también la fuente de aislamiento influye en la respuesta de adhesión de la bacteria a cada material, ya que fue posible observar que las células aisladas de la superficie de equipos de acero inoxidable presentaron mayor capacidad de adhesión al mismo material con respecto a las aisladas de las bandas de polipropileno, y viceversa, es decir las células aisladas de polipropileno presentaron mayor capacidad de adhesión a polipropileno que las aisladas de materiales de acero inoxidable (Figura 12). Fenómeno que puede ser debido a un efecto de adaptación al material.

Otro hecho importante que pudiera estar relacionado con el deterioro del producto, es que en ambos materiales las cepas que presentaron mayor adhesión fueron aquellas aisladas de producto en deterioro, posiblemente debido a la selección de las cepas con mayor capacidad a tolerar el calor del proceso de cocción, germicidas y/o conservadores, y porque no, como consecuencia a su capacidad de instalación en el equipo.

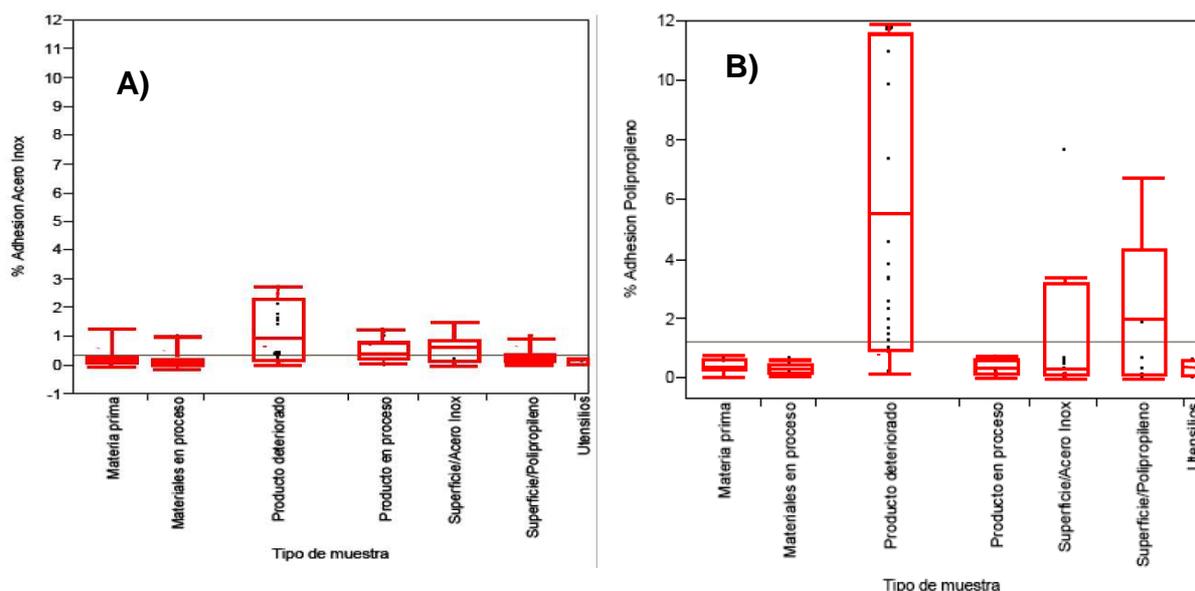


Figura 12. Adhesión de las cepas de *Leuconostoc* spp. según fuente de aislamiento y material de contacto: A) Acero inoxidable; B) Polipropileno.

La mayor capacidad de adhesión de algunas cepas con respecto a otras también sugiere que las biopelículas que pudieran estar conformadas en los equipos y materiales estarían conteniendo mayormente aquellas cepas que lograron retenerse con mayor facilidad en estos materiales. Esto podría explicar que las cepas que fueron aisladas de producto deteriorado, son las que mayor capacidad de adhesión presentan.

La diversidad de respuestas de adhesión observada en los dos materiales, suponen dificultades en la eliminación con un proceso convencional de higienización, dado que, algunos individuos que conforman una biopelícula o entre biopelículas, serán más susceptibles a la eliminación que otros.

Entre especies de *Leuconostoc* también se encontraron diferencias en las respuestas de adhesión (Figura 13). Las cepas de la especie *Lc. fallax* (<1.25%) son las que mayor capacidad de adhesión al acero inoxidable presentaron con respecto a las de la especie *Lc. mesenteroides* (<1.01%) y *Lc. lactis* (<0.43%). No así en

polipropileno, en donde se encontró que la especie *Lc. lactis* (11.9%) mostró mayor capacidad de adhesión que las cepas de *Lc. mesenteroides* ($\leq 2.1\%$) y *Lc. fallax* ($\leq 2.0\%$). Cabe resaltar que la especie *Lc. fallax* y *Lc. mesenteroides* fueron aisladas de la empresa, en un 33.3% (4/12) y 50% (6/12) respectivamente, de las muestras del equipo elaborado con acero inoxidable (Cepeda-Márquez, *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que mediante el método de muestreo convencional de frotado con torunda, empleado por Cepeda-Marquez *et al.* (2009), no recuperó cepas de *Lc. lactis* de ninguna muestra de materiales de polipropileno. Sin embargo, *Lc. lactis* fue la flora predominante en la mayoría de los productos deteriorados (14/27), en su mayoría (11/14) aislados de cinco eventos de deterioro en los primeros meses del año 2010.

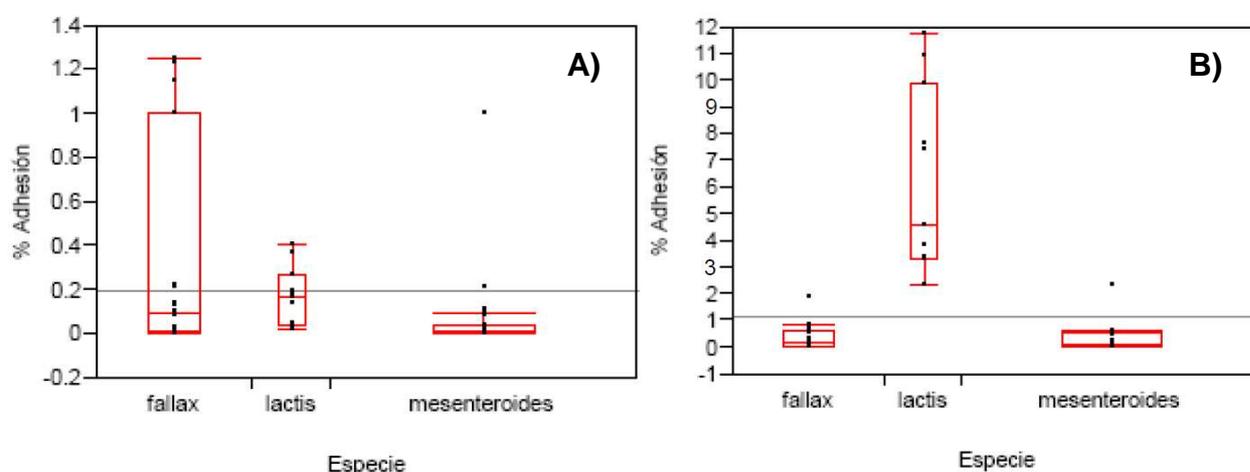


Figura 13. Adhesión de las cepas de *Leuconostoc* spp. según fuente de aislamiento y material de contacto: A) Acero inoxidable; B) Polipropileno.

En diversos grados, las cepas de las especies *Lc. mesenteroides*, *Lc. fallax* y *Lc. lactis* tienen capacidad de adherirse. Sin embargo las cepas de las especies *Lc. plantarum* y *Lc. citreum* mostraron una casi nula capacidad ($<0.000023\%$ y $<0.0000019\%$, respectivamente).

La capacidad de adhesión sugiere una opción de caracterización fenotípica de las cepas de *Leuconostoc*, ya que fue posible observar una gran diversidad de respuestas, dependiente del material de soporte en el que se promueve la adhesión, la fuente de aislamiento y la especie a la que pertenecen. Sin embargo, la respuesta observada por cada cepa tiene influencia de su naturaleza, por lo que no se podría emplear como caracterización de cepas ajenas al ambiente de donde fueron aisladas.

Nuestro interés de conocer la capacidad de las células de *Leuconostoc* para adherirse a superficies de trabajo de la empresa, así como su diversidad de

respuestas, fue por ser el paso inicial y primordial para la eventual colonización y la posible formación de biopelículas.

7.2.2. Colonización de superficies de acero inoxidable y polipropileno por *Leuconostoc* spp.

Una vez que observamos que tres de las especies de *Leuconostoc* presentan capacidad para adherirse irreversiblemente a las superficies de prueba, estas pueden estar facultadas también para multiplicarse adheridas a la superficie, formando microcolonias y permanecer atrapadas dentro de una matriz de polímeros. Cabe mencionar que es de interés esta capacidad dado que también a esta matriz se le pueden adherir más bacterias del exterior (libres) y otro tipo de macromoléculas, aumentando el tamaño de la biopelícula. Este hecho incrementa la posibilidad no sólo de causar deterioro, sino de comprometer la inocuidad del producto (Consternon *et al.*, 1987).

La capacidad de instalación y colonización de un microorganismo en la superficie de un equipo de producción, depende de la cantidad de células adheridas a la superficie, la concentración y disponibilidad de nutrientes, las características propias del material de soporte y las del microorganismo, así como de las condiciones ambientales (Consternon *et al.*, 1987).

De los anteriores uno de los principales factores que debíamos controlar era la concentración de nutrientes en el vehículo. En la naturaleza los medios potenciales para promover una colonización en ambientes abiertos son el agua de lluvia, agua de riego, aguas negras, tierra, heces, o material proveniente de otras plantas en descomposición, en la industria (ambientes cerrados) pueden ser restos grasos, detergentes orgánicos o las propias partículas residuales de alimentos (Consternon *et al.*, 1987). Cualquiera que sea el vehículo, es de interés estudiarlo ya que está demostrado que las células bacterianas tienden a quedar atrapadas en materiales orgánicos. Por esta razón para simular condiciones prácticas, se recomienda que el vehículo o medio de promoción de la colonización consista en algún material orgánico (Beuchat *et al.*, 2001a). En nuestro estudio para semejar las condiciones reales en la empresa, empleamos una suspensión de sólidos de salchicha.

Los primeros experimentos de esta etapa, consistieron en identificar cuál es la concentración de salchicha en suspensión que promueve abundantemente el desarrollo de *Leuconostoc*. Estos ensayos mostraron que concentraciones por arriba de 1% de salchicha en suspensión en DP, sostienen el desarrollo de células de

Leuconostoc en estado planctónico. Sin embargo, concentraciones superiores a 5% causaban una inhibición del desarrollo de la bacteria durante las primeras 8 h de incubación a 30°C (datos no mostrados).

De forma individual para cada cepa (87) y por triplicado, empleando las condiciones de almacenamiento señaladas (1% de salchicha/30°C/100%HR). Se promovió la colonización de ambos materiales. Se monitoreo cada 2 h las primeras 12 h y cada 12 h las próximas 36 h, realizando una serie de lavados con SSF estéril para eliminar las células que no estuvieran inmersas en biopelícula, para posteriormente, removerla, empleando un Vortex® a máxima velocidad (3,000 rpm) durante 2 min.

Con los recuentos del triplicado de cada cepa, se construyeron cinéticas de colonización y se modelaron empleando el programa DMfit® de Combase® (www.combase.cc). Se modeló de forma independiente cada cinética con la ecuación de Baranyi y de Gompertz. Se calcularon los parámetros cinéticos: duración de fase Lag, máxima velocidad de colonización (Vmax) y máxima población alcanzada (Pmax). Se realizaron gráficos de correlación para cada uno de los parámetros cinéticos obtenidos en ambos modelos. Los resultados se muestran en las Figuras 14, 15 y 16.

Finalmente, mediante un análisis de residuales se identificó que la ecuación de Baranyi es quien representa mejor la mayoría de las cinéticas de colonización (528/546) de las cepas de *Leuconostoc* en polipropileno y acero inoxidable, dado que muestra valores mas pequeños (Figura 17).

Así como con los perfiles genéticos y la capacidad de adhesión, las cinéticas de colonización también muestran algunas particularidades según especie y material de superficie (Figura 18).

En general se alcanza una mayor población por cm² en las superficies del polipropileno, con respecto al acero inoxidable, observándose más marcado este efecto en las cepas de *Lc. mesenteroides*, en el que algunas cepas alcanzan 9 logaritmos de UFC/cm² en las primeras 12 h de colonización.

El 88.7% (79/87) de las cepas mostraron capacidad para colonizar superficies de acero inoxidable, mientras que en polipropileno sólo las cepas de *Lc. plantarum* (3) y *Lc. citreum* (1) no manifestaron tal capacidad.

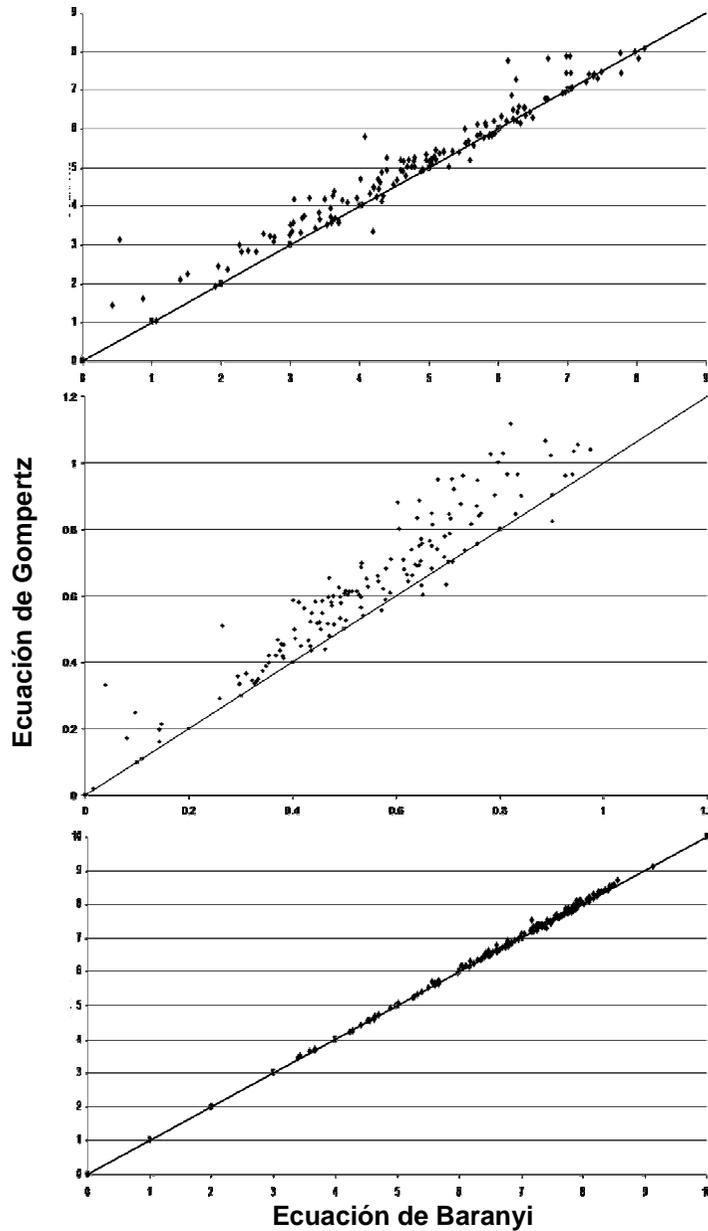


Figura 14. Correlación de los valores de duración de fase Lag (h) obtenidos por ambas ecuaciones.

Figura 15. Correlación de los valores de velocidad máxima alcanzada (LogUFC/h/cm²) obtenidos por ambas ecuaciones.

Figura 16. Correlación de los valores de población máxima alcanzada (LogUFC/cm²) obtenidos por ambas ecuaciones.

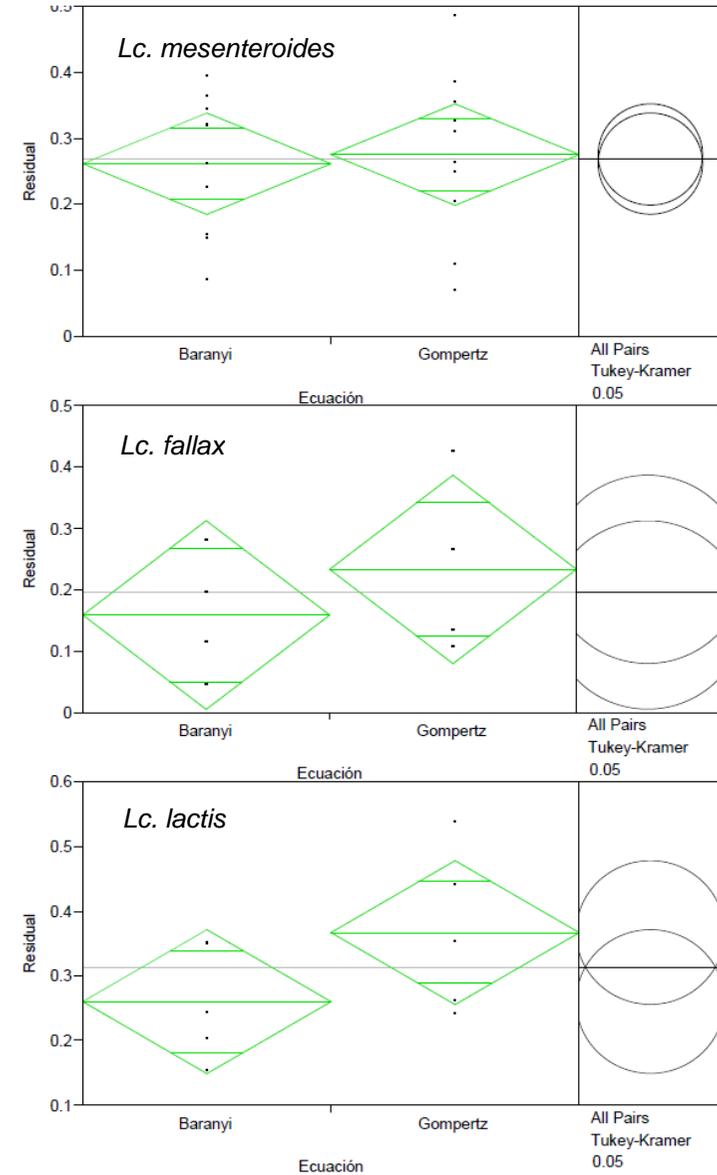


Figura 17. Análisis de residuales de cada ecuación (Baranyi vs. Gompertz) y prueba de Tukey-Kramer, según especie.

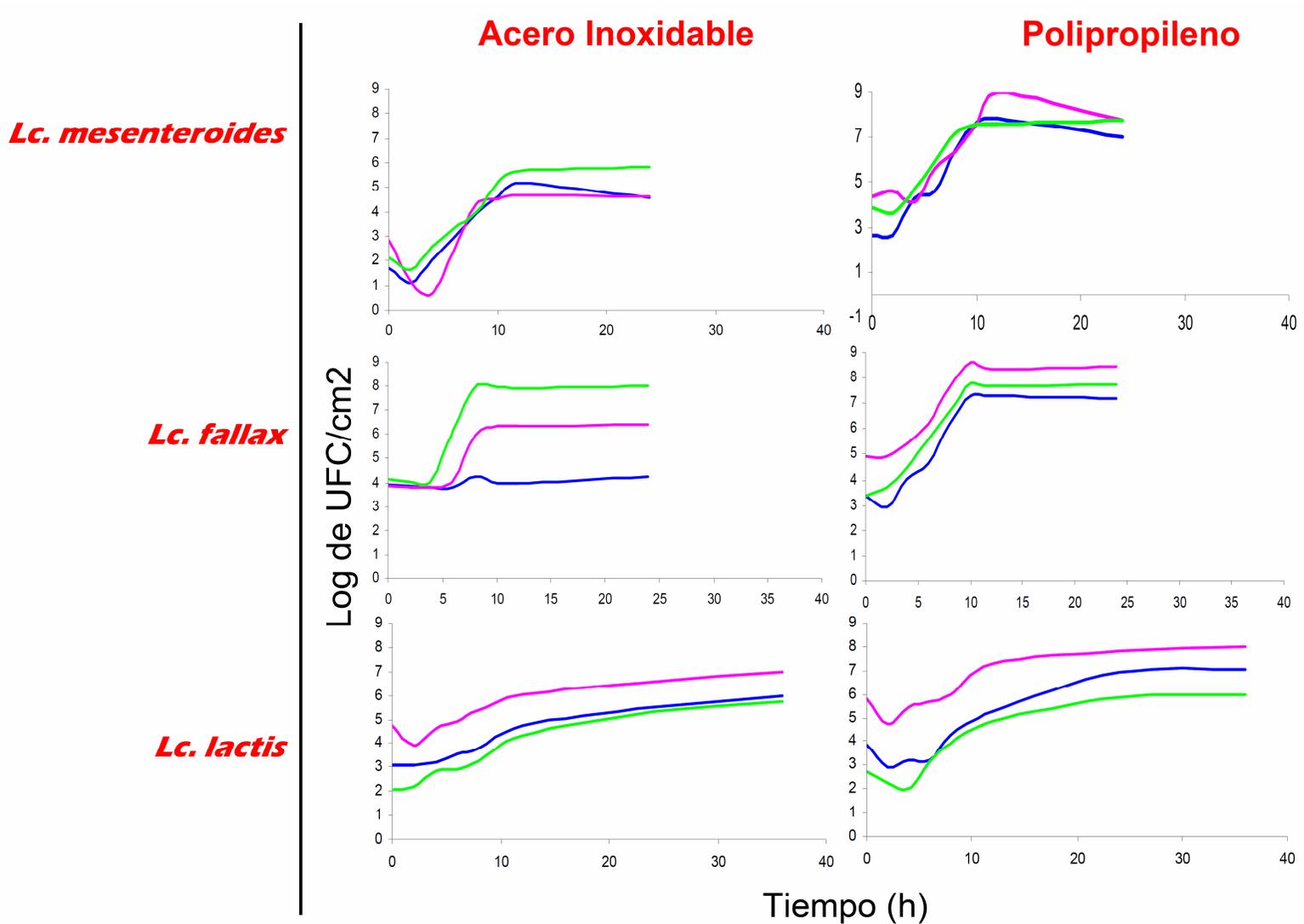


Figura 18. Ejemplos de cinéticas de colonización observadas para cada especie de *Leuconostoc*, según material de superficie de contacto. Sólo se muestran algunos patrones de comportamiento.

La diversidad de respuestas expresada en el tiempo en que las cepas de *Leuconostoc* inician la colonización fue: *Lc. mesenteroides* > *Lc. fallax* > *Lc. lactis* > *Lc. plantarum* ~ *Lc. citreum* (Figura 19). Este resultado puede estar influenciado por la cantidad de cepas evaluadas de cada especie, dado que coincide con el orden descendente del número de estas.

Por otro lado, las cepas de *Lc. lactis* son las que en promedio colonizan con más lentitud las superficies de acero inoxidable y polipropileno (tardan 36h en alcanzar una población de 6 a 7 Log UFC/cm²), en contraste con las otras especies que en menos de 12 h ya superaron esa población (Figura 18). No obstante, la población máxima que pueden alcanzar algunas cepas es de poco más de 8 LogUFC/cm² antes de las 72h en ambos materiales (resultados no mostrados en el grafico).

En las Figuras 19, 20 y 21, muestran diagramas de cajas para las respuestas observadas para cada parámetro cinético. En ellas podemos observar la diversidad de respuestas de cada especie en cada material.

En acero inoxidable las cepas de *Lc. fallax*, mostraron mayor diversidad de respuestas, que el resto de las especies. Para el 13.8% de las cepas de *Lc. fallax* (4/29) se observó un desarrollo limitado o nulo, 16 cepas al menos incrementaron en 3 LogUFC/cm² la población inicial de células adheridas y 19 lograron alcanzar entre 7.5 y 8 LogUFC/cm². En polipropileno, el comportamiento de colonización de las cepas de *Lc. fallax* fue muy similar entre ellas, todas alcanzan aprox. 8 LogUFC/cm² alrededor de las 10h después de iniciada la colonización.

Nuestros resultados evidencian que a 100% de HR, en presencia de sólidos residuales de salchicha (1% en suspensión) a 30°C, es posible inducir la colonización de las superficies a prueba, por las cepas de *Leuconostoc* aisladas de la empresa. En un estudio previo realizado por Hernández-Hernández *et al.* (2010) en el que buscó promover la colonización de polipropileno por *Lc. mesenteroides* a cuatro humedades relativas (60, 86, 97 y 100%) a 22°C, encontró que *Lc. mesenteroides* colonizó la superficie de polipropileno cuando la HR fue mayor o igual a 86%. Además observó un incremento de 1.9 LogUFC/cm² en la población después de 48h/22°C y 3.3 LogUFC/cm² en 97 y 100% HR, respectivamente, encontrando adicionalmente que a mayor humedad, mayor velocidad de colonización. Confirmando que *Lc. mesenteroides* desarrolla en superficies de polipropileno con residuos de salchicha y condiciones de HR favorables. En la empresa productora de salchicha la humedad

relativa en la línea de producción fluctúa entre 62 y 97%, por lo que podemos inferir que el control de la humedad relativa durante la producción es una actividad prioritaria para limitar la adhesión bacteriana y colonización de las superficies del equipo. Finalmente esta acción, acompañada de un control de la temperatura y limpieza continua del equipo, podría contribuir a disminuir la generación de reservorios de *Leuconostoc* en el ambiente de producción de la empresa.

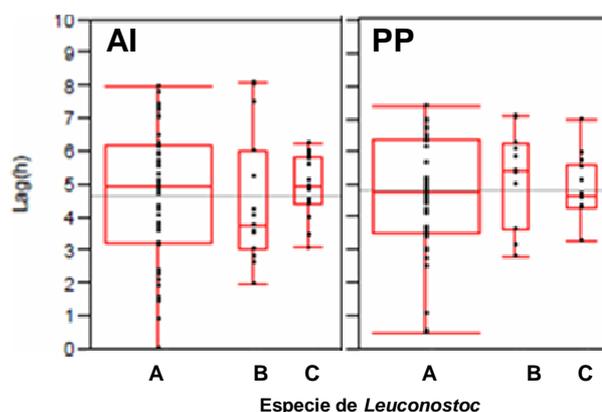


Figura 19. Tiempo en que las cepas de *Leuconostoc* comienzan la colonización (Lag) de acero inoxidable (AI) y polipropileno (PP), según especie. Donde; A: *Lc. mesenteroides*, B: *Lc. fallax* C. *Lc. lactis*

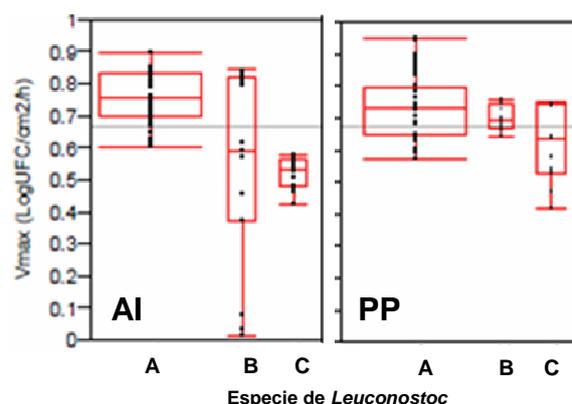


Figura 20. Velocidad máxima alcanzada por las cepas de *Leuconostoc* en colonización de acero inoxidable (AI) y polipropileno (PP), según especie. Donde; A: *Lc. mesenteroides*, B: *Lc. fallax* C. *Lc. lactis*

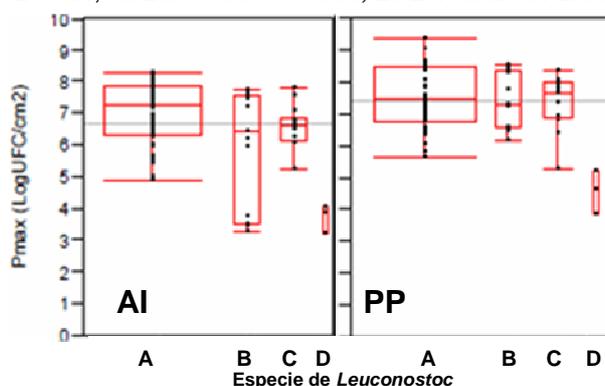


Figura 21. Población máxima alcanzada por las cepas de *Leuconostoc* en colonización de acero inoxidable (AI) y polipropileno (PP), según especie. Donde; A: *Lc. mesenteroides*, B: *Lc. fallax*, C. *Lc. lactis*, D. *Lc. plantarum*

Un acontecimiento que captó nuestra atención fue que en la mayoría de las cinéticas de colonización de las cepas (444/522) se observó una etapa inicial de inactivación de las células adheridas (antes de las primeras cuatro horas). Este efecto puede ser debido a la presencia de trazas de conservador en la salchicha empleada en la suspensión que se utilizó como vehículo y promotor de la colonización.

De las cinéticas de colonización anteriores, y mediante el modelado matemático de primer orden con la ecuación de Baranyi, fue posible obtener parámetros cinéticos de colonización. Con ellos y tomando como eje principal la capacidad de adhesión a polipropileno, pudimos identificar los perfiles fenotípicos “críticos” que pueden estar asociados a la incidencia de deterioro del producto. En la Figura 22 se muestran los “perfiles fenotípicos críticos” encontrados en las células que colonizan polipropileno. No se muestran los resultados en acero inoxidable por no exceder el 1.25% de adhesión de las células al material, lo cual sugiere un riesgo menor al que admiten las células que se adhieren a polipropileno.

Se definió como cepas con un perfil fenotípico crítico a aquellas que presentaron la mayor capacidad de adhesión (>6% adhesión), iniciaron con mayor rapidez la colonización [Lag] (<5h), colonizaron con mayor velocidad (>0.6 LogUFC/cm²/h) y alcanzaron una mayor población en la superficie (>5 Log UFC/cm²).

Reuniendo estas características pudimos detectar cinco cepas, la 5, 20, 85, 100 y 101, todas de la especie *Lc. lactis*, cuatro obtenidas de producto deteriorado, y la cepa 5 que fue aislada de equipo de producción. Las dos primeras pertenecen al genotipo I y las siguientes al III. Es necesario recordar que el genotipo III involucra cepas con dos años de diferencia en su aislamiento de producto deteriorado, lo que sugiere que las características fenotípicas críticas que poseen, pueden estar asociadas con su permanencia en el equipo.

Estas cepas y otras de las especies *Lc. fallax* y *Lc. mesenteroides* con gran capacidad para adhesión (<1% en polipropileno), son el objeto de estudio idóneo para evidenciar el potencial para formar biopelículas mediante MEB y probar su susceptibilidad a germicidas.

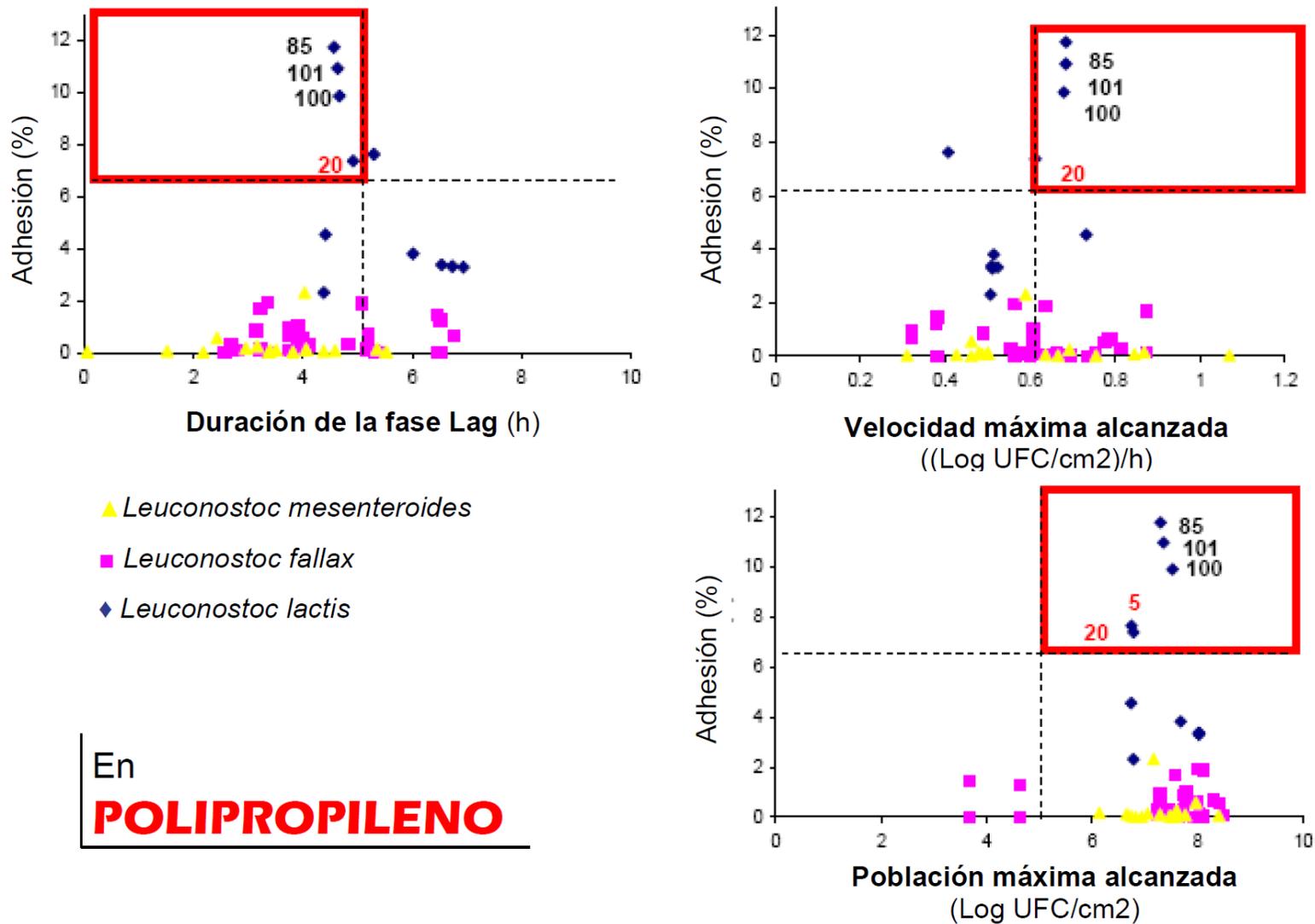


Figura 22. Relación entre adhesión y los parámetros de colonización observadas para cada especie de *Leuconostoc*, según material de superficie de contacto. En el recuadro rojo se muestran los genotipos críticos.

7.2.3. Confirmación de la formación de biopelículas mediante métodos ópticos.

Es de conocimiento generalizado que en ambientes naturales e industriales, las bacterias tienden a adherirse y formar biopelículas (Consternon *et al.*, 1995). Mediante microscopia electrónica de barrido se ha demostrado la presencia de biopelículas bacterianas en hojas de numerosas especies de plantas, tanto en su follaje como en sus frutos (Morris *et al.* 1997). Así mismo, se han detectado con frecuencia en superficies inertes dentro de sistemas acuosos, en materiales médicos y en el equipo en fábricas de alimentos (Consternon *et al.*, 1987; Donlan *et al.*, 2002). Jessen y Lammert (2003) han observado que pueden formarse biopelículas con cultivos bacterianos axénicos o mixtos sobre superficies de trabajo de una industria procesadora de carne. Sin embargo, no existe información sobre la generación de biopelículas de microorganismos con potencial deteriorador en la industria de embutidos cárnicos.

En nuestro estudio, mediante MEB se investigó la presencia de formaciones tridimensionales de aglomerados celulares en la superficie de acero inoxidable y polipropileno, materiales con que están elaborados los equipos de trabajo de la línea de producción de salchicha. Se empleó una mezcla de cepas según especie utilizando las que presentaron al menos una característica de adhesión y colonización crítica (Ver cepas empleadas en este estudio Cuadro 11). La mezcla de cepas se inóculo sobre placas de acero inoxidable y placas y esferas de polipropileno. Se promovió la adhesión (4h) y colonización durante 72 h de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 6.2.3.2. Mediante una serie de lavados se eliminaron las células libres con la finalidad de observar sólo aglomerados celulares. Las biopelículas fueron deshidratadas y posteriormente fijadas con oro, para finalmente ser observadas al microscopio electrónico de barrido.

En la superficie de las placas de acero inoxidable fue posible observar surcos y depresiones características de la microtopografía del material. Esta característica de relieve fue constante en todas las placas y a lo largo de toda su extensión. Mientras que en la superficie de las esferas y placas de polipropileno se observaban cavernas, grietas y depresiones más profundas que las mostradas en acero inoxidable. En algunas aéreas de la superficie en las que aparentemente no existen fracturas se observa una red de fibras de no más de 10 μm de espesor como una fase continua en la superficie.

Cuadro 11. Características fenotípicas de interés de las cepas que fueron empleadas para evidenciar la formación de biopelículas según especie.

Especie	No de cepa	Genotipo	Parámetros de colonización			
			Adhesión (%)	Lag (h)	Vmax (LogUFC/h)	Pmax (Log UFC/cm ²)
<i>Lc. mesenteroides</i> <i>subsp.</i> <i>mesenteroides</i> y <i>dextranicum</i>	44	XI	0.043	2.1	0.3	6.9
	43		0.045	2.4	0.6	7.2
	29	XVIII	0.465	4.3	0.9	7.3
	31	XXIII	1.23	5.3	0.7	8.1
	22	XXXIII	1.07	3.6	0.6	7.9
	98	XXVI	1.34	3.4	0.7	7.8
<i>Lc. fallax</i>	46	XVII	1.26	1.8	0.64	5.6
	48		1.24	1.6	0.67	6.3
	105	X	1.56	1.4	0.56	5.8
	74	XX	0.89	3.4	0.59	6.5
	93	XI	0.43	2.5	0.89	8.1
<i>Lc. lactis</i>	5	I	4.45	4.8	0.3	6.8
	20		4.38	4.9	0.32	7.2
	85	III	11.02	4.5	0.67	7.3
	100		11.23	4.3	0.64	7.6
	101		11.47	4.5	0.63	7.4
<i>Lc. plantarum</i>	2	I	0.000023	3.5	0.032	3.7
	41	II	0.000019	3.6	0.029	3.7
	42		0.000003	3.9	0.034	3.4

La mayor adhesión de las células de *Leuconostoc* al polipropileno, puede deberse a que este al poseer mayor número de este tipo de fracturas y estructuras tridimensionales, puede albergar y atrapar con mayor facilidad una gran cantidad de células y por lo tanto, estas bacterias con mayor facilidad puedan evadir la remoción mecánica. Este hecho explica en parte porque aunque algunos genotipos de *Lc. lactis* que tienen mayor capacidad para adherirse a polipropileno, fue nulo su porcentaje de recuperación de la superficie de las bandas en la línea de producción de la salchicha en la empresa. Silva *et al.* (2008) en su investigación acerca de la adhesión y viabilidad de *Listeria monocytogenes* en la superficie de acero inoxidable, polipropileno, vidrio y mármol, transcurrido el tiempo de incubación, la viabilidad de las células adheridas en los diferentes materiales fue diferente en cada material y dependiente de su rugosidad y carga electrostática de las células y del material inerte.

Las micrografías de las placas de acero inoxidable y polipropileno evidenciaron la presencia de aglomerados celulares de las especies *Lc. mesenteroides*, *Lc. fallax* y *Lc. lactis*, no así para *Lc. plantarum* (Figura 23).

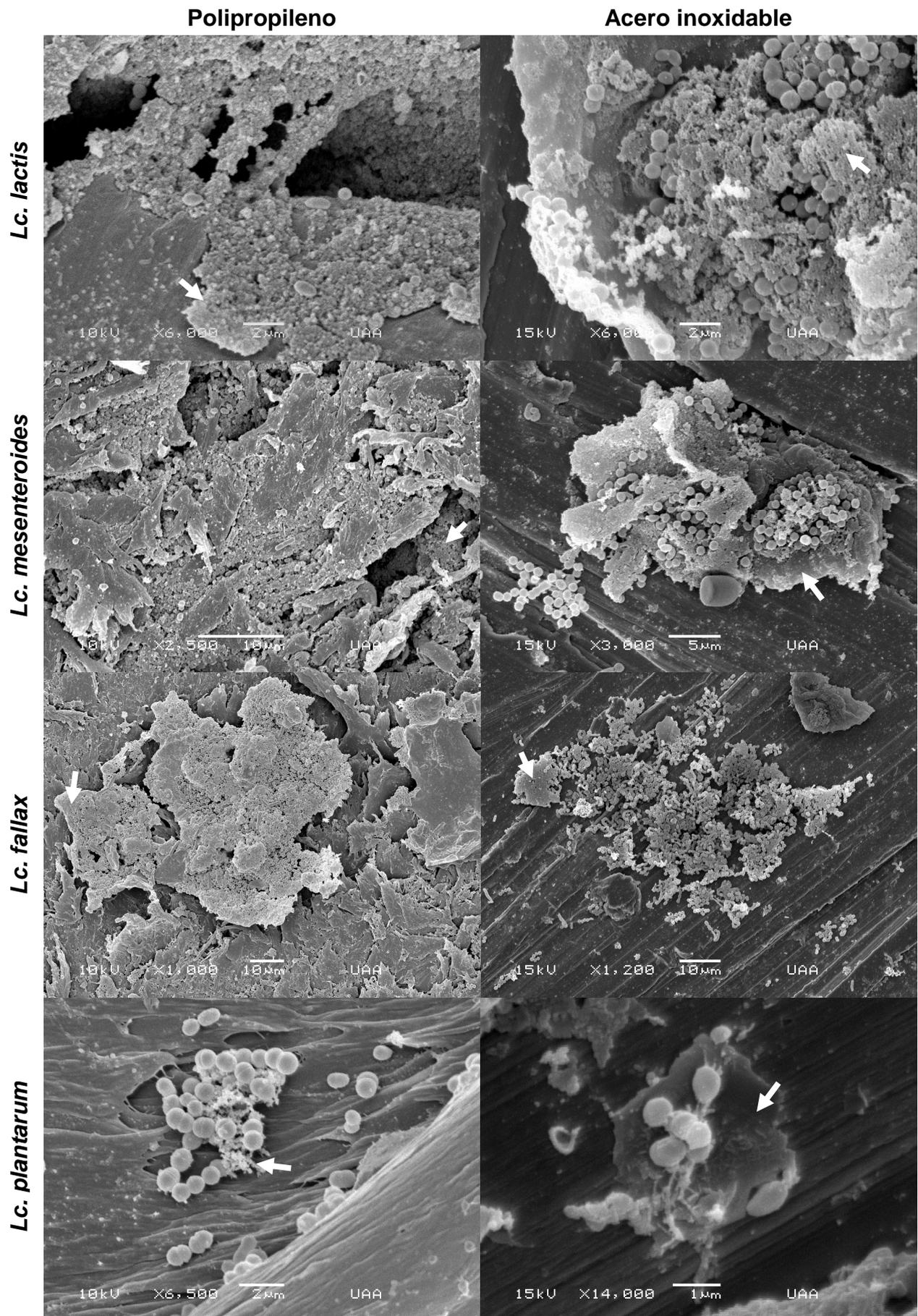


Figura 23. Micrográficas electrónicas de barrido de aglomerados celulares y biopelículas de *Leuconostoc* spp. sobre polipropileno y acero inoxidable, después de 72h de almacenamiento a 30°C en suspensión de salchicha 1% p/v. La flecha muestra SPE.

La placa que contenía una mezcla de cepas de *Lc. lactis* y una mezcla de *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *dextranicum* son las que muestran biopelículas con mayor producción de SPE y por ende de mayor tamaño.

Cabe resaltar que la especie *Lc. lactis* mostró mayor capacidad para “revestir” la superficie de las placas de polipropileno formando biopelículas, con un espesor de hasta 4µm. Estas evidencian gran cantidad de células anegadas en un espeso tapete de SPE.

En la figura 24, se muestra una serie de microfotografías de la superficie de acero inoxidable y polipropileno a lo largo de ocho días de almacenamiento a 30°C en suspensión de salchicha (1%p/v), en donde se puede observar el proceso de formación de una biopelícula de *Lc. lactis*. Se observó un aumento en la población en colonización de *Lc. lactis* en los dos materiales, así mismo, se detectó la presencia de SPE desde el segundo día, mostrándose un aumento en su generación conforme se avanza la colonización. A los cuatro días, se apreció ya la biopelícula bien estructurada que contiene numerosas células embebidas en una matriz de polisacáridos. En las microfotografías correspondientes al día ocho fue posible observar una diferencia entre el espesor y forma de la biopelícula, evidenciándose que la formada sobre acero inoxidable es de mayor espesor (~7.2 µm), que la formada sobre polipropileno (~1.7 µm). No obstante, el tamaño de la biopelícula generada sobre polipropileno fue de mayor extensión (>96 µm), que la generada sobre acero inoxidable (~48 µm).

En la Figura 25, se muestran algunas mediciones que realizamos del tamaño y espesor de las biopelículas (72h) de *Lc. lactis*, *Lc. mesenteroides* y *Lc. fallax*, datos que también son indicadores del potencial de intalación de las cepas al material de soporte.

La mezcla de cepas de *Lc. plantarum*, coincidentemente con su casi nula capacidad para adhesión y colonización antes presentadas, mostró agregados de no más de 40 células, sin embargo en las microfotografías es posible observar que las células muestran características visuales que evidencian están en estado de reproducción, pese a que tienen ya 72 h de colonización, lo que evidencia que tienen posibilidad de colonización pero son aún más lentas que el resto de las especies.

Está documentado que la producción de SPE y el tamaño poblacional que se alcanza en la formación de la biopelícula está regulado por la percepción en quórum (QS) (Waters *et al.*, 2005; Barbara-Vu *et al.*, 2009). El QS permite que las bacterias se

mantengan en comunicación entre ellas y regula la expresión de genes específicos que a su vez regulan la densidad de población en una biopelícula (Rivas *et al.*, 2005; Valenzuela *et al.*, 2006). En general, el proceso de QS implica la producción, liberación y la detección de moléculas de señalización química, en el que al generarse una comunidad microbiana cada habitante de esta puede regular su expresión génica dependiente del tamaño de su comunidad (Hooshangi *et al.*, 2008). Es decir, a una densidad de población determinada, los genes implicados en la diferenciación y maduración de la biopelícula se activan y evitan la segregación de más SPE (Waters *et al.*, 2005; Millar *et al.*, 2001).

De manera generalizada se ha estudiado el potencial deteriorador y patógeno de células en estado planctónico (libres), sin embargo, la proliferación de una bacteria dentro de una biopelícula le provee de protección frente a los agentes que pudieran producirle un estrés. Su tamaño, composición de sus SPE y su arquitectura salvaguarda su viabilidad, reduciendo o limitando a la penetración de agentes que pudieran dañar su integridad celular (Costerton *et al.*, 1999; Costerton y Veeh, 2003). En la industria alimenticia cobra mayor relevancia la instalación de bacterias con acción perjudicial al producto o al consumidor, dado que las bacterias al estar protegidas en una biopelícula, esta funciona como un foco rojo que de forma continua o discontinua contamina diversos lotes de producción. Finalmente, la prevención de su formación y su eliminación son una acción prioritaria (Donlan, 2002).

Para prevenir la formación de la biopelícula es necesario un adecuado proceso de limpieza y desinfección de los equipos y materiales de producción en la industria (Naessens *et al.*, 2005). Sin embargo, en la empresa productora de salchichas, la inadecuada dosificación y uso indiscriminado de germicidas, aunado a la poca facilidad para el desmontado total de sus piezas, ha permitido que permanezcan viables una gran diversidad de bacterias, en sus líneas de producción. Se ha demostrado en este estudio que un número insignificante de células viables que logren subsistir e instalarse en los materiales de producción, con un mínimo de nutrientes provenientes de los residuos del producto y auspiciado por condiciones ambientales favorables, son capaces de prosperar a cantidades inusitadas en comunidades microscópicas de microorganismos.

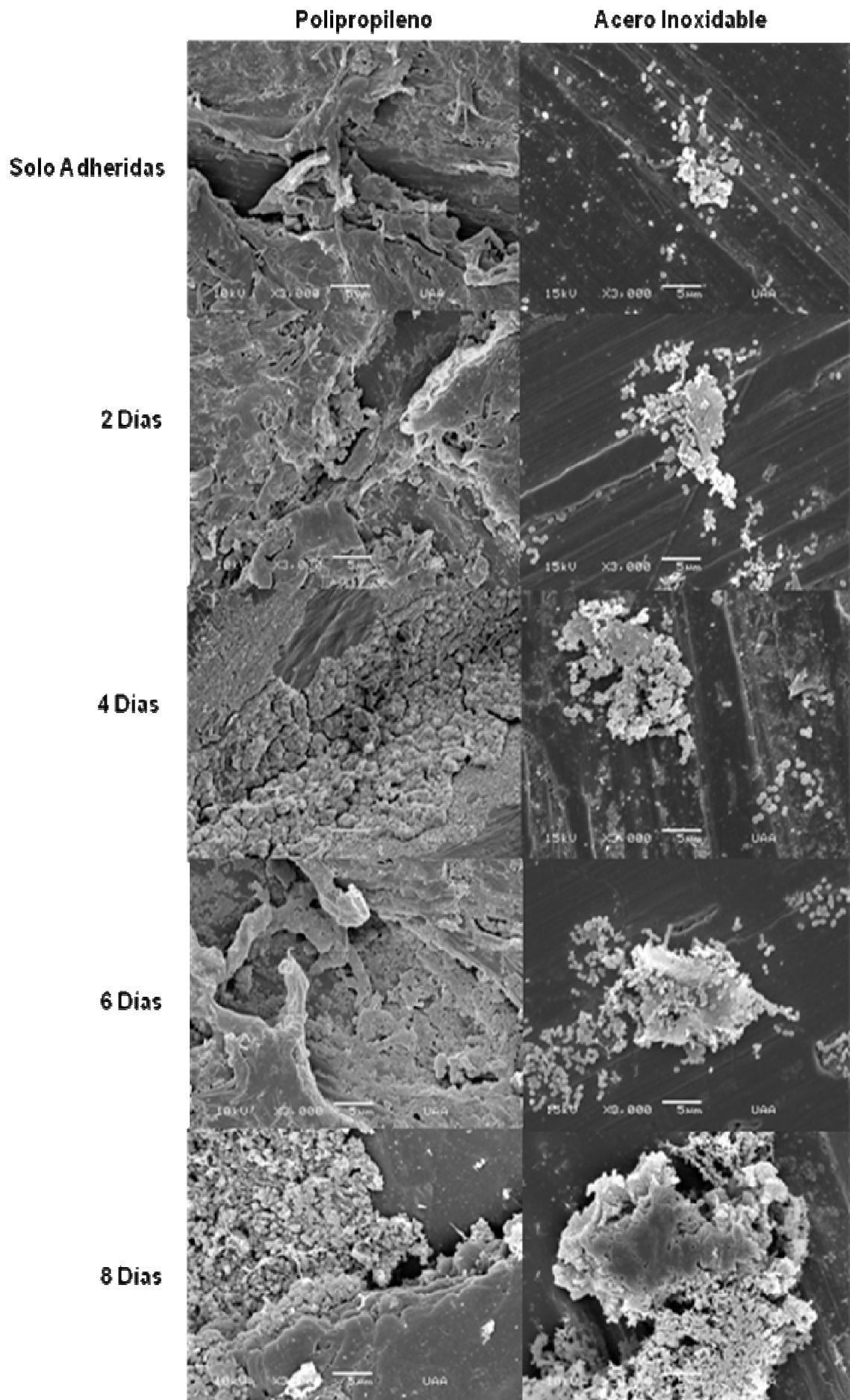
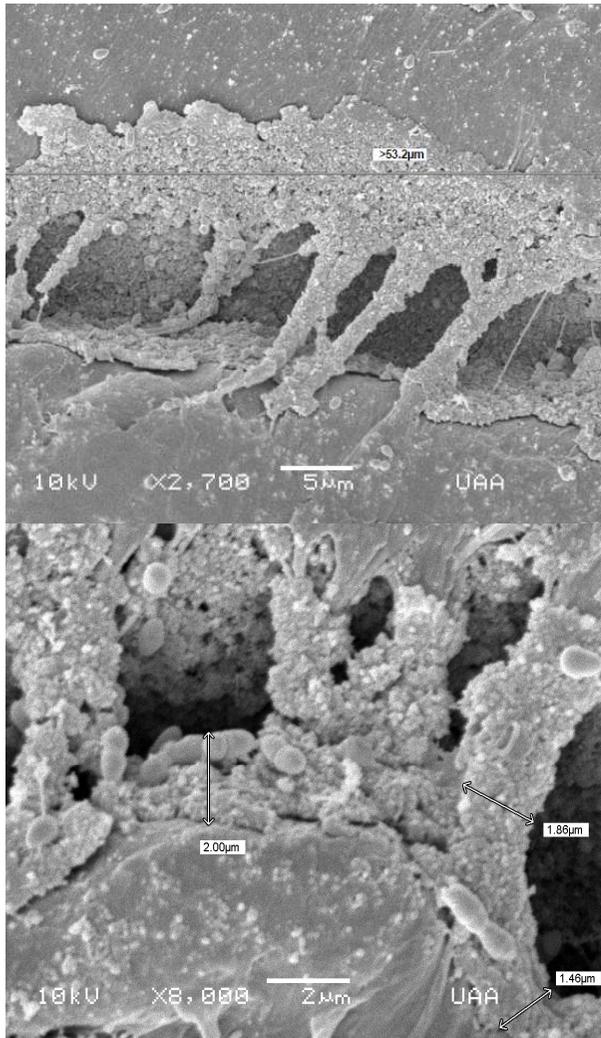
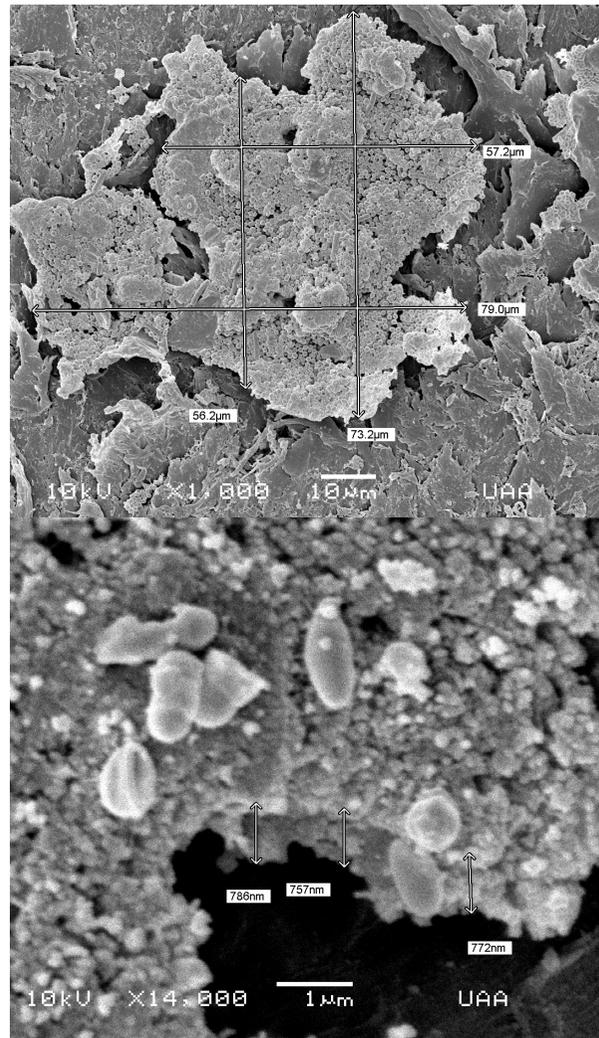


Figura 24. Micrografías electrónicas de barrido de placas de polipropileno y acero inoxidable con células de *L. lactis* en colonización a 30°C, en una suspensión de salchicha 1%. 77

Lc. lactis



Lc. mesenteroides



Lc. fallax

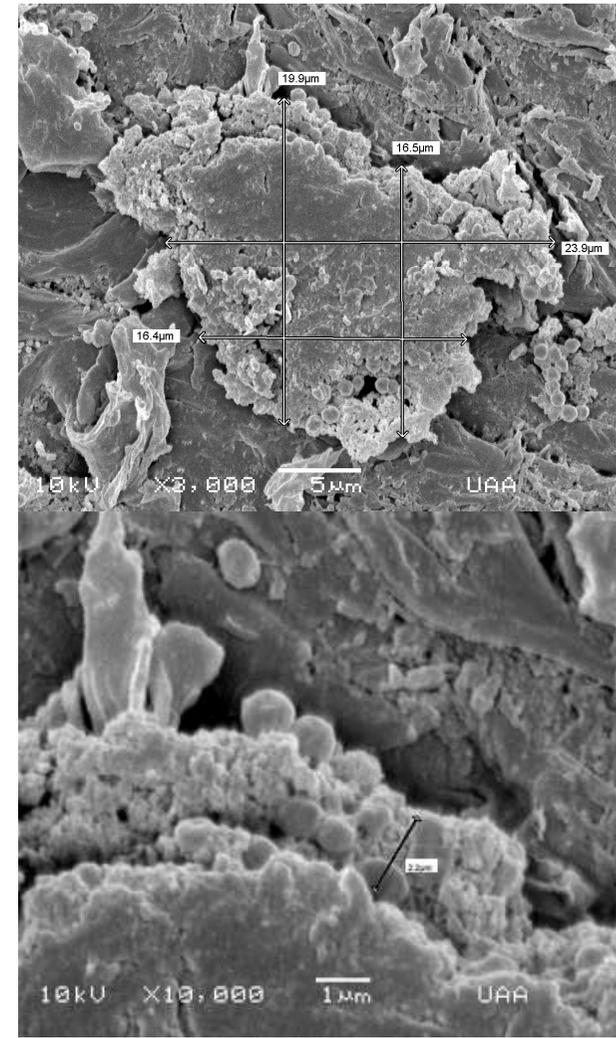


Figura 25. Tamaño y espesor de las biopelículas de *Leuconostoc* spp. sobre polipropileno, después de 72h de almacenamiento a 30°C en suspensión de salchicha 1%

7.3 Asociación del genotipo con la capacidad de adhesión y los parámetros cinéticos de colonización de las cepas de *Leuconostoc* spp.

Uno de los problemas más viejos y fascinantes de la genética, y que se encuentra en el corazón de innumerables investigaciones, es el entender la relación entre genotipo y fenotipo. El genotipo es simplemente la información genética que tiene un organismo. Fenotipo es un concepto algo más complicado, pero podemos definirlo como una característica detectable de un organismo; la complicación más obvia con este segundo concepto es que se trata de algo relativo. Algunos investigadores han empleado una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en sus experimentos en los que eliminaron una buena parte de los ~6000 genes uno por uno. Luego compararon la viabilidad de sus mutantes. Esto les permitió identificar 44 y 18 genes que son esenciales, es decir, si se eliminan la levadura no sobrevive (Dowell *et al.*, 2010). La relevancia de este estudio es que abre las puertas, por primera vez, al estudio de la interacción genotipo-fenotipo al nivel molecular en un organismo completo. Todos los estudios previos a este están basados en pequeños sistemas, o comparaciones simples de coincidencias entre un ADN tipificado y una o varias características asociadas de alguna manera a él. Ahora es posible estudiar prácticamente la totalidad del genotipo y compararlo contra la totalidad del fenotipo de manera simultánea. En el experimento anterior los autores optaron por un fenotipo categórico y radical para su primer análisis, básicamente la célula sobrevive o no, pero muchos fenotipos, que son más complejos y sutiles, pueden ser estudiados con este sistema, las posibilidades y las interrogantes son infinitas, pero la posibilidad de dar una explicación general, a un problema fundamental de la biología, puede estar bastante cerca.

Aunque no se realizó un estudio tan a profundidad como el antes mencionado, dado que no implicó modificación genética alguna, fue posible identificar que existe una relación entre cantidad de bandas presentes en un perfil genético según especie y su capacidad de adhesión a las superficies (Figura 26). Es decir, conforme mayor era el número de bandas, también es mayor la capacidad de adhesión. Este hecho tiene lógica dado que el iniciador que empleamos en la técnica de tipificación RAPD reconoce una región específica del gen de la dextranasa, enzima que participa en la degradación de sacarosa, para la posterior formación de dextranos, compuesto involucrado con la capacidad de adhesión de una bacteria (Consternon *et al.*, 1987).

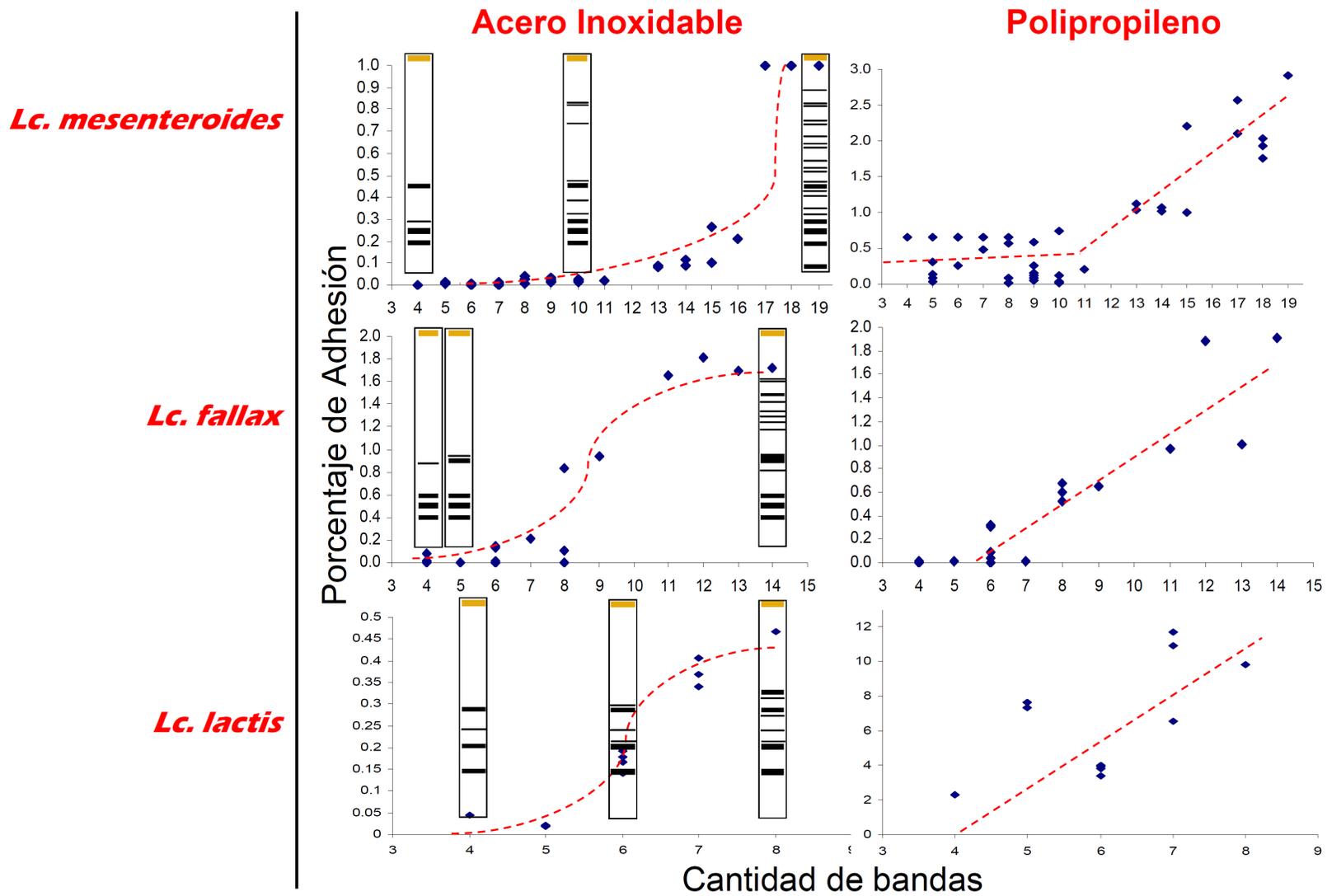


Figura 26. Correlación del porcentaje de adhesión contra el número de bandas presentes en el perfil genético (RAPD) de las cepas de *Leuconostoc* spp. según material de superficie de contacto.

Curiosamente, también fue posible observar una relación entre los grupos de genotipos que se formaron al elaborar el dendrograma de asociación genética mediante RAPD, con los parámetros cinéticos de colonización de las cepas (Figuras 27a, 27b y 27c).

En la Figura 27a, podemos observar que aun cuando hay cepas de *Lc. mesenteroides* que no están asociadas genéticamente entre ellas (0% similitud), estas muestran un comportamiento similar en ambos parámetros de colonización, era entonces de esperarse que en cepas que al estar asociadas más del 60% de las cepas con un porcentaje de similitud superior al 50% no se observaran claramente estas agrupaciones en comportamiento.

No es así para las cepas de *Lc. fallax*, en donde se pudieron encontrar diversas asociaciones (figura 27b). La más evidente fue que el comportamiento de las cepas aisladas en el periodo de abril-agosto fue diferente a las aisladas de agosto-noviembre ($P=0.6703$), siendo menores los valores de velocidad de colonización y población en aquellas que se aislaron en la primera mitad del año. Coincidentemente, los genotipos que asocian cepas con más del 60% de similitud genética, presentaron respuestas iguales en velocidad máxima (V_{max}) y población máxima alcanzada (P_{max}) ($P=0.783$ y $P=0.8259$, respectivamente).

Para *Lc. lactis*, dado que presenta menor número de genotipos y existe una menor similitud genética entre ellos fue posible observar con mayor claridad las agrupaciones de respuestas (Figura 27c).

Estas asociaciones, con sus limitaciones y objeciones a las que pueden ser sujetas, demuestran que si buscamos a nivel molecular, puede existir la relación entre la información genética propia de cada cepa (determinada por su historial) y su capacidad para instalarse en los equipos de producción de la industria.

Esta información es necesaria para comprender el porqué las cepas de *Leuconostoc* aisladas de la empresa productora de salchicha, han permanecido en la empresa y causando brotes de deterioro del producto a lo largo de varios años.

Como ya hemos mencionado, en los esfuerzos para controlar a los microorganismos dentro de una empresa de alimentos, es esencial conocer la biodiversidad de la flora presente en sus equipos, su comportamiento en las superficies de trabajo y su susceptibilidad a los agentes que se emplean para su control.

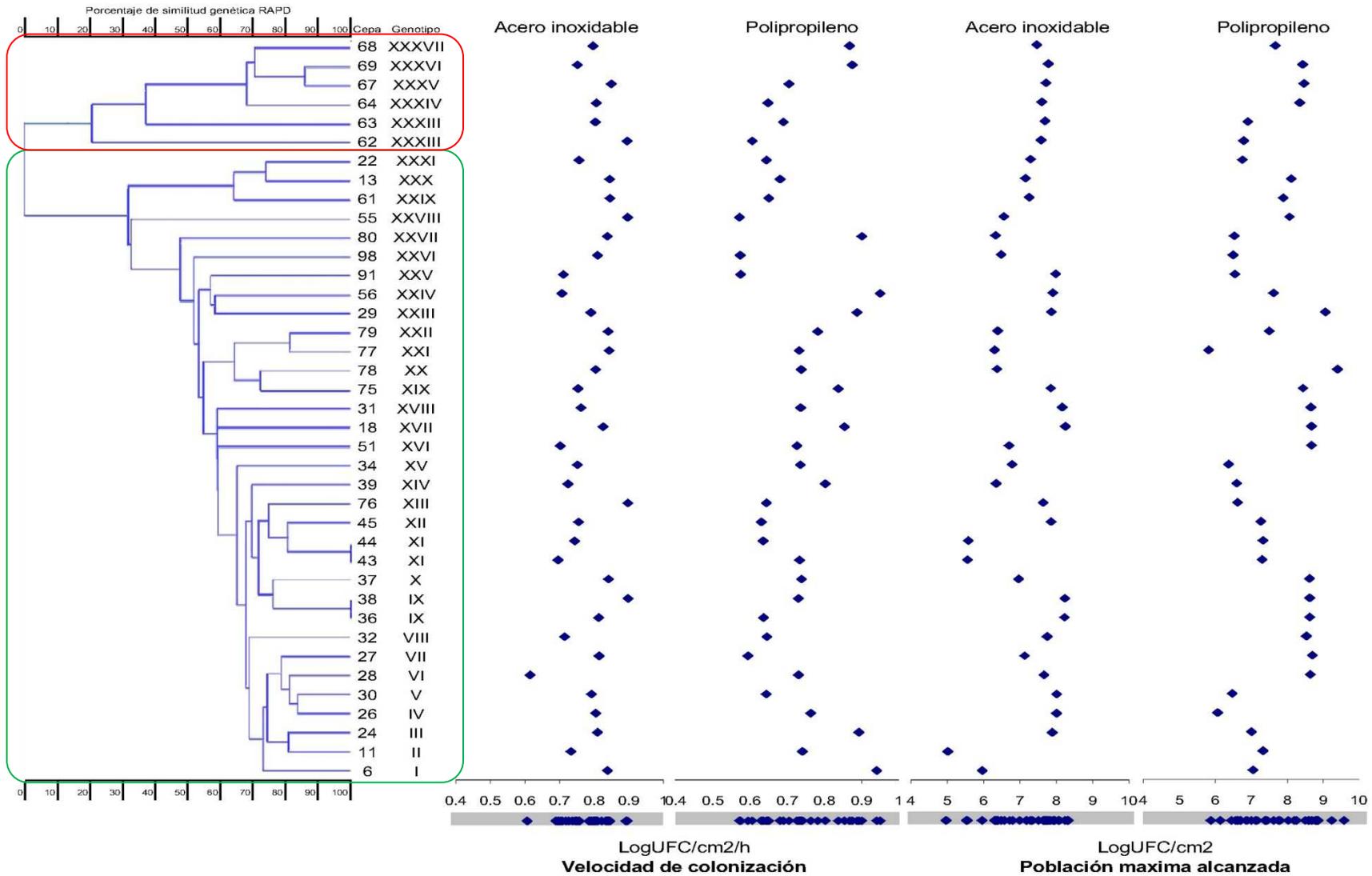


Figura 27a. Asociación entre el genotipo y los parámetros cinéticos de *Lc. mesenteroides* al colonizar AI y PP

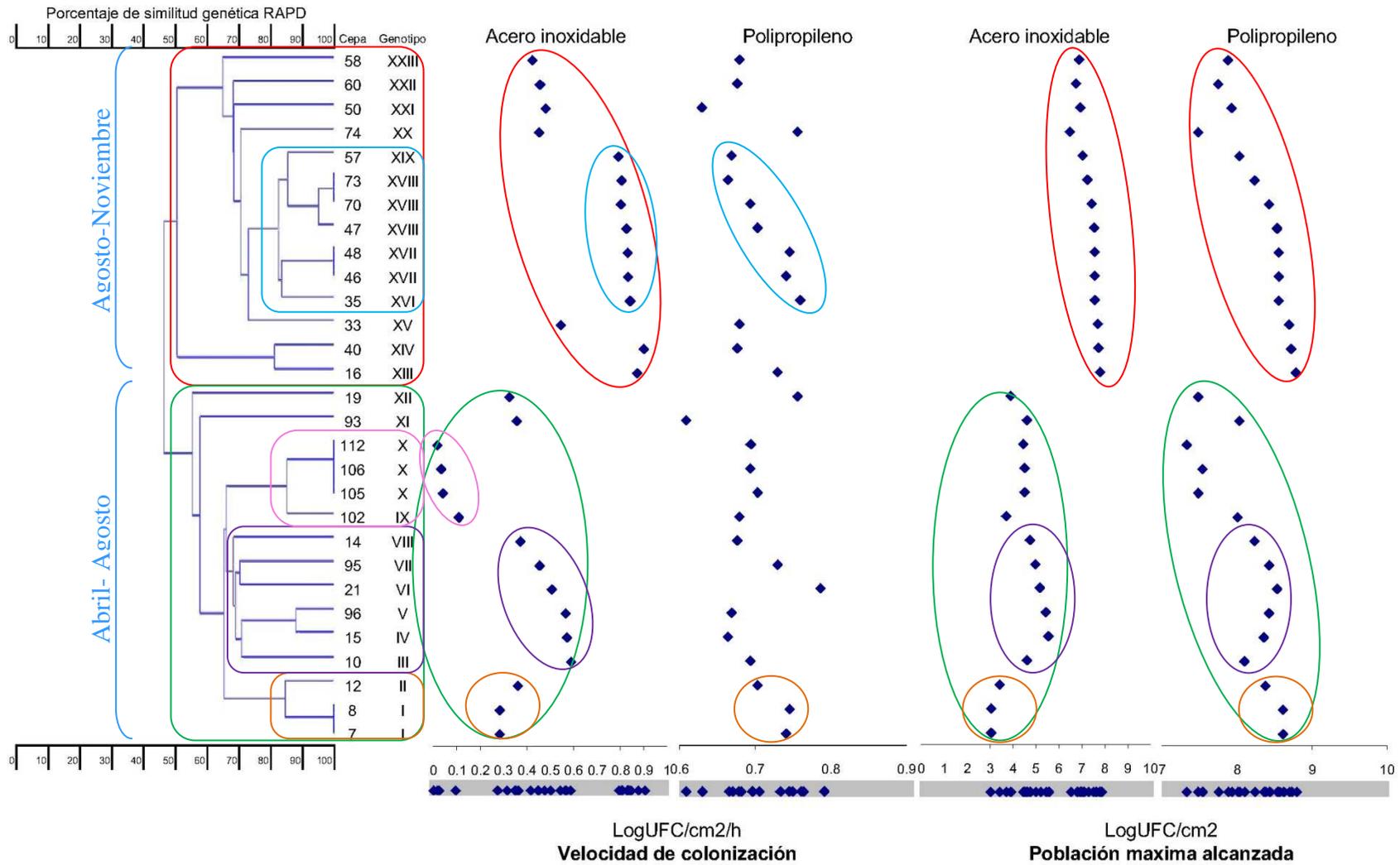


Figura 27b. Asociación entre el genotipo y los parámetros cinéticos de *Lc. fallax* al colonizar AI y PP.

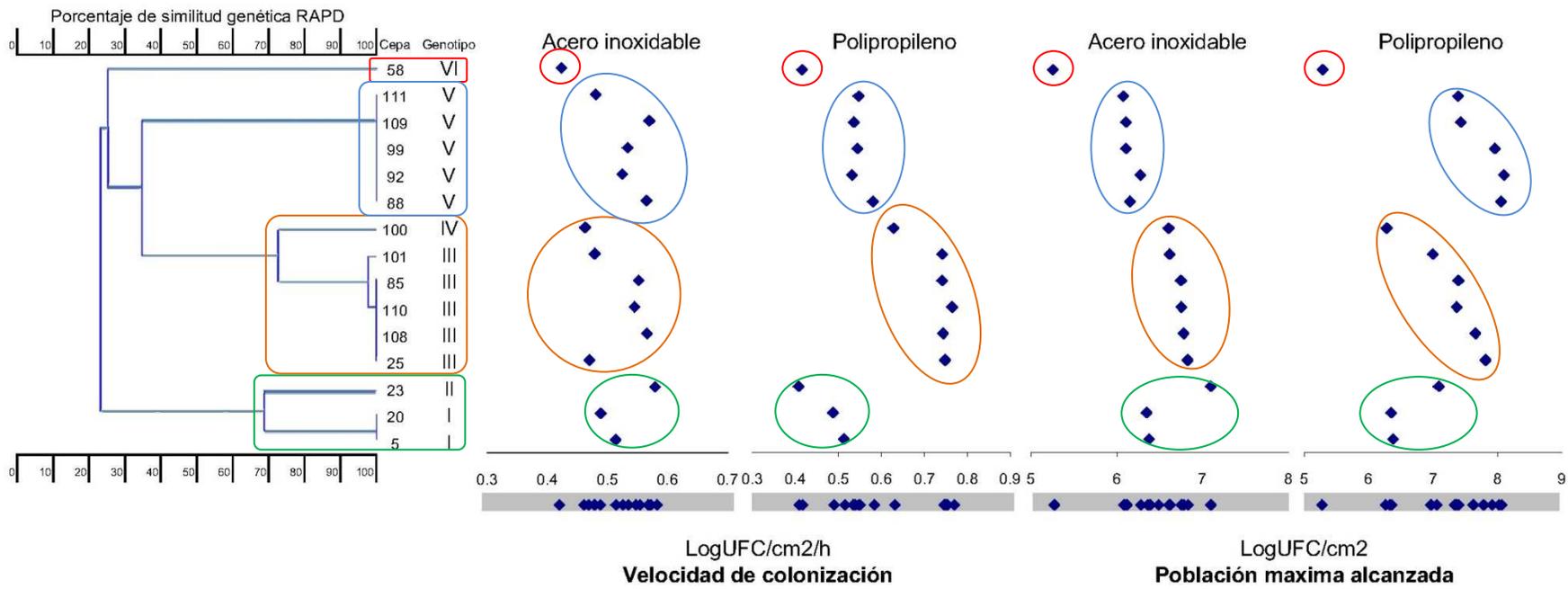


Figura 27c. Asociación entre el genotipo y los parámetros cinéticos de *Lc. lactis* al colonizar AI y PP.

Una vez que tuvimos en conocimiento que la mayoría de las especies *Leuconostoc* recuperadas del producto y ambiente de la empresa tienen capacidad de formar biopelículas, se evaluó si los germicidas que actualmente emplean para el control microbiano son efectivos, cuando las células se encuentran en una biopelícula.

7.4. Susceptibilidad de las cepas de *Leuconostoc spp.* con capacidad de formar biopelículas, a la acción de germicidas químicos.

La prevención de la contaminación es el método más eficiente para asegurar la inocuidad y estabilidad de los alimentos, por lo que el esfuerzo está encaminado a protegerlos de fuentes primarias de contaminación. En ocasiones esto no es posible, particularmente para los alimentos que se consumen crudos y que se producen en estrecha relación con la fuente de contaminación, como lo son las frutas y verduras, que crecen en o cerca del suelo. Sin embargo, en los alimentos industrializados es posible reducir al mínimo la probabilidad de contaminación si se llevan correctamente las medidas de higienización de los equipos y materiales de producción.

Es casi inevitable el ingreso de microorganismos a una industria de alimentos, teniendo como vehículo las materias primas. Sin embargo, el control de estos a lo largo de la línea de producción para evitar su instalación, es un compromiso inherente a la producción de alimentos.

Cuando se tienen problemas por causa de microorganismos instalados en sus equipos y se desea erradicarlos, la primera acción debe ir encaminada a impedir el ingreso e instalación de nuevos gérmenes y en segunda instancia, pero no menos importante, la eliminación de los reservorios ya presentes.

Las biopelículas microbianas son verdaderamente una fortaleza que impide la eliminación de sus habitantes con un proceso de lavado y desinfección común. Exige ahora una disgregación más rigurosa de la matriz de polisacáridos mediante métodos mecánicos o químicos, ya que de no aplicarse tal tratamiento, el desinfectante puede tener un mínimo o nulo efecto sobre las células inmersas en ella.

La empresa ha encaminado sus esfuerzos por controlar los brotes de deterioro, incluyendo una gran diversidad de conservadores químicos y orgánicos en sus productos, además, de aplicar una gran variedad de germicidas en sus equipos y materiales de producción. Sin embargo, es posible que debido a su inadecuada dosificación y prolongado uso, las bacterias causantes de deterioro han creado resistencia a estos agentes.

Actualmente la empresa productora de salchichas emplea germicidas a base de sales cuaternarias de amonio y ácido peroxiacético. Para ambos germicidas se ha demostrado un amplio espectro de efectividad contra bacterias (Park y Beuchat. 1999). Sin embargo, Cepeda-Marquez *et al.* (2009) han reportado que existen cepas que inoculadas en forma planctónica sobre modelos de superficies de trabajo de la empresa, logran tolerar las condiciones de concentración y tiempo de exposición empleadas rutinariamente en la empresa. Nuestra inquietud del mal funcionamiento de sus agentes germicidas, surge del hecho de haber encontrado en repetidas ocasiones en producto deteriorado, cepas que conforman el mismo genotipo, que aparentemente ha logrado permanecer en las instalaciones de la empresa por varios años.

Este acontecimiento, aunado al gran potencial para formar biopelículas que presentan algunos genotipos, se decidió investigar la susceptibilidad de las cepas de *Leuconostoc spp.* con capacidad de formar biopelículas, a la acción de algunos germicidas químicos.

Para probar los germicidas empleados en la empresa sobre estructuras de biopelículas ya totalmente formadas, se necesita conocer el tiempo indicado para obtener una biopelícula en el que la población celular en colonización ya alcanzó su máximo y que en su totalidad permanece viable. Para ello, se promovió la adhesión y colonización como se describe en la sección 6.2.3.1, para una mezcla de cepas de cada especie (Ver Cuadro 11). Se monitoreo la población viable en la biopelícula cada día hasta un total de ocho. Con este experimento se pudo definir que 72 h eran suficientes para obtener una biopelícula “recién formada”.

A cada especie de forma individual, sobre esferas de cada material con la biopelícula recién formada, se le aplicaron mediante inmersión los germicidas. Las condiciones de aplicación se encuentran en el Cuadro 4. Una vez concluido el tratamiento, se neutralizó el efecto del germicida y se removió la biopelícula, para realizar el recuento de sobrevivientes. Los resultados se muestran en las Figuras 28a, 28b, 28c y 28d. En general, en acero inoxidable y polipropileno el efecto total del germicida fue mayor cuando se aplicó agua electrolizada neutra (AEN) (3.5-3.8 LogUFC/cm²), que cuando se aplicó cloro (1.6-2.7 LogUFC/cm²) y este a su vez mayor que la reducción mostrada ante el ácido peroxiacético (APA) (1.4-2.3 LogUFC/cm²).

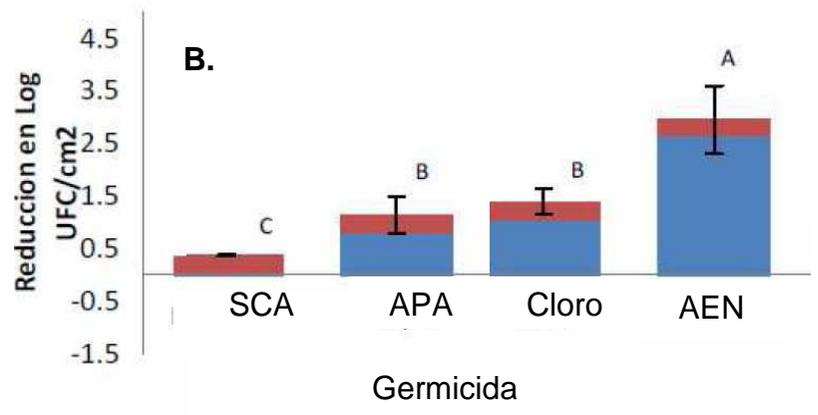
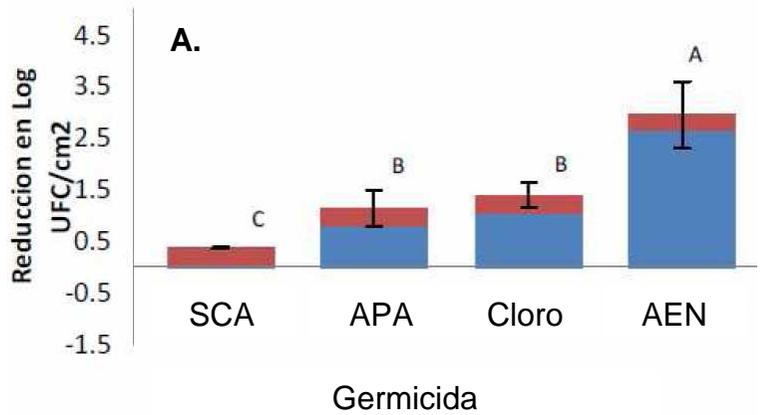


Figura 28a. Efecto de los germicidas sobre células de *Leuconostoc mesenteroides* inmersas en una biopelícula (72 h).

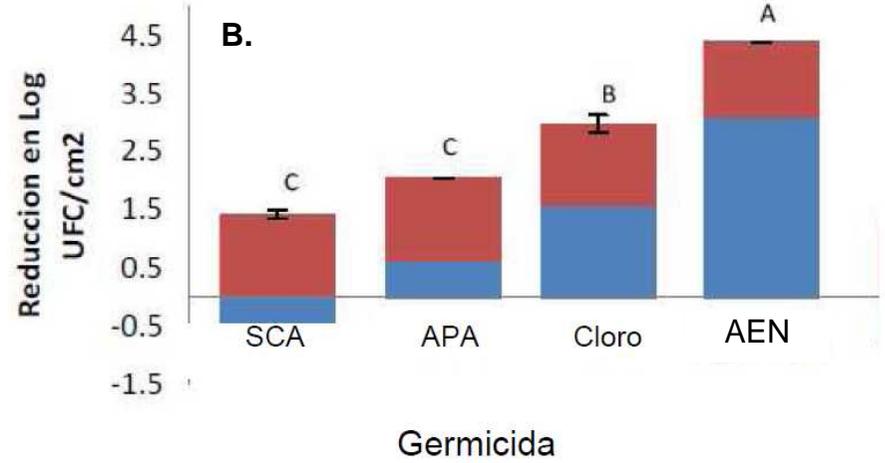
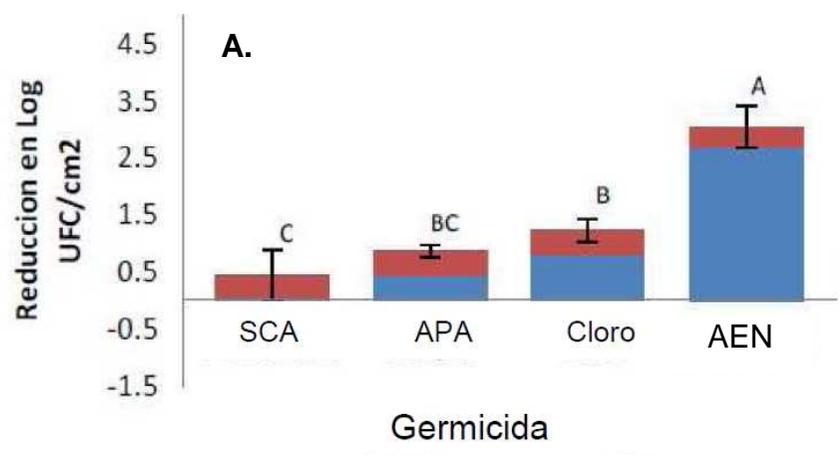


Figura 28b. Efecto de los germicidas sobre células de *Leuconostoc lactis* inmersas en una biopelícula (72 h).

■ Efecto puro del germicida.
 ■ Efecto del arrastre por el tratamiento.
 ■ Efecto total del tratamiento germicida.

Misma letra indica no diferencias significativas ($P > 0.05$) entre germicidas, mediante comparación de medias de Tukey. Las barras de error pertenecen al efecto total del tratamiento. A. Colonizando acero inoxidable. B. Colonizando polipropileno.

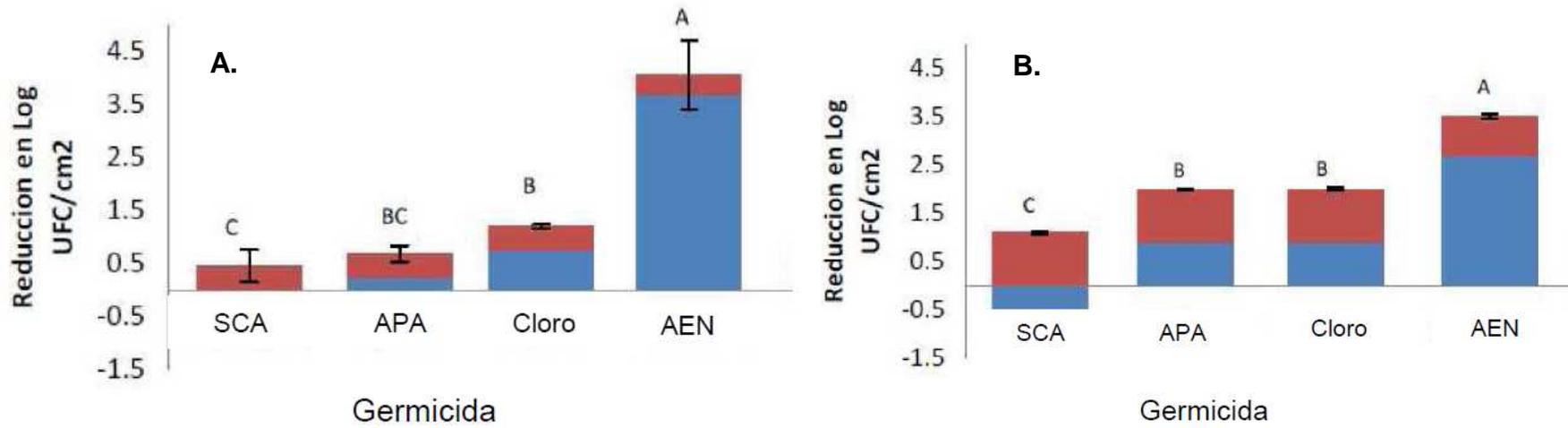


Figura 28c. Efecto de los germicidas sobre células de *Leuconostoc fallax* inmersas en una biopelícula (72 h).

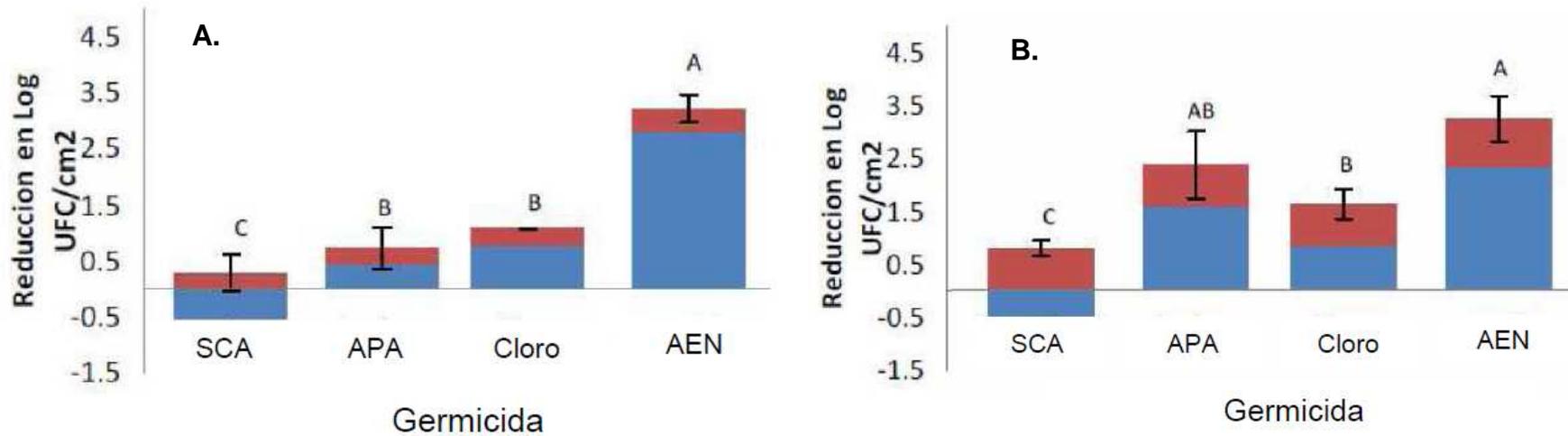


Figura 28d. Efecto de los germicidas sobre células de *Leuconostoc plantarum* inmersas en una biopelícula (72 h).

■ Efecto puro del germicida. ■ Efecto del arrastre por el tratamiento. ■ Efecto total del tratamiento germicida.

Misma letra indica no diferencias significativas ($P > 0.05$) entre germicidas, mediante comparación de medias de Tukey. Las barras de error pertenecen al efecto total del tratamiento. A. Colonizando acero inoxidable. B. Colonizando polipropileno.

El AEN es el producto de un nuevo concepto de germicidas, que consiste en una mezcla de compuestos como, hidroperóxidos (H_2O_2), ácido hipocloroso, hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, cloruro de sodio y peróxidos inorgánicos (O_2) de vida corta. Es obtenida mediante electrolisis de una solución diluida de cloruro de sodio (NaCl), al pasar por el voltaje (9-10V) de una corriente directa, producida por dos electrodos con carga opuesta contenidos en una cámara. Experimentalmente se ha demostrado que el AEN es un tratamiento efectivo en la limpieza y desinfección de superficies de cocina (Hinton *et al.*, 2007), eliminación de patógenos de los alimentos (Venkitanarayanan *et al.*, 1999) y ha sido utilizada como tratamiento médico quirúrgico y dental para el tratamiento de heridas, así como para la desinfección de equipo y utensilios médicos (Rutala, 2002). Arevalos-Sanchez, *et al.*, 2010, reportó que a una solución de AEN con concentración de 500ppm de agentes oxidantes logró reducir ~ 6 LogUFC/cm² de *Lactococcus lactis* UQ2 en biopelícula, expuesta durante un minuto al tratamiento germicida. Es necesario resaltar que el efecto germicida sobre *Leuconostoc* de ~ 4 LogUFC/cm² es relativamente aceptable, dado que estas cepas se encuentran inmersas en una matriz de polisacáridos. Cepeda-Márquez (2009) reportó números de BAL cercanos a 2 y 3 LogUFC/cm² en las bandas de corte y pelado y en la pared metálica de dicha banda, respectivamente. Cabe resaltar, que el muestreo fue realizado mediante frotado con torunda; es de esperarse que algunas bacterias atrapadas en una biopelícula no sean recuperadas y cuantificadas. Aunque no precisamente es un dato de la cantidad de *Leuconostoc* presente en los equipos y bandas de la empresa, un elevado número de BAL podría sugerir la presencia del germen. El AEN es la opción viable para la reducción de los reservorios de *Leuconostoc* en la empresa, debiéndose aplicar posterior a una limpieza que involucre un proceso físico de frotado o sonicado (Hamilton, 1993; Gagnon *et al.*, 1999). Es recomendable que su uso sea alternado con otros germicidas eficientes contra el microorganismo problema.

El empleo de soluciones de cloro son los desinfectantes más comúnmente utilizados en las plantas alimentarias para la desinfección de superficies de trabajo y su efectividad está ampliamente estudiada. En forma diluida, los desinfectantes basados en cloro son incoloros, relativamente no tóxicos y no manchan. Son generalmente los germicidas más económicos. Sin embargo, se les ha asociado con procesos de corrosión del acero inoxidable y la formación de cloraminas, por lo que la

empresa productora de salchicha no lo ve como una opción viable, además de que no son compatibles con desinfectantes a base de sales cuaternarias de amonio.

Por otro lado, las soluciones de ácido peroxiacético contienen una mezcla de ácido peracético, ácido acético y peróxido de hidrógeno. Estos desinfectantes son efectivos contra un gran número de microorganismos patógenos, incluidas las esporas bacterianas (Park y Beuchat, 1999). Son eficaces en un amplio rango de pH y se aplican con agua fría o tibia. El ácido peroxiacético tiene un olor acre y se debe prepararse en un área bien ventilada, dado que el concentrado comercial suele irritar las mucosas. A concentraciones de 80-100ppm es efectivo y reduce sustancialmente su potencial corrosivo para la piel (Park y Beuchat, 1999). Su limitado efecto mostrado ante las cepas de *Leuconostoc* en biopelícula estudiadas, puede deberse a que ya se ha empleado en la empresa y posiblemente estas cepas hayan generado cierta resistencia a este.

Los otros dos germicidas que la empresa utiliza de forma más rutinaria son a base de sales cuaternarias de amonio. Cabe mencionar que este germicida no reduce significativamente ($P=0.8713$) la población de *Leuconostoc* de ninguna de las cepas que probamos de cada especie cuando estas se encuentran inmersas en una biopelícula. Otro hecho importante es el efecto de arrastre, este se observó en mayor grado en las biopelículas generadas en polipropileno, que en las generadas en acero inoxidable (≤ 1.25 vs. 0.4 LogUFC/cm²).

En general, para cada mezcla de cepas por especie, no existe diferencia significativa ($P=0.018$), es decir, la respuesta a cada germicida es similar independientemente de la especie de *Leuconostoc*. Sin embargo, cuando probamos ya no con mezcla de cepas por especie, sino con una mezcla de cepas por genotipo, exponiendo las mezclas individualmente al germicida que logró una mayor reducción de las células en biopelícula, sí conseguimos identificar por separado el efecto de reducción sobre cada genotipo, y con ello pudimos observar con mayor claridad la diversidad de respuestas. En la Figura 29, se muestran las reducciones de las células de *Leuconostoc spp.* inmersas en una biopelícula, por genotipo, cuando se expusieron a AEN. Se reproduce de nuevo el efecto de arrastre: mayor en las biopelículas generadas en polipropileno, que en las generadas en acero inoxidable. En acero inoxidable, es posible observar un menor efecto total del tratamiento germicida ($1.2-4.6$ LogUC/cm²), que el logrado por el AEN sobre las biopelículas en polipropileno ($2.1-6.3$ LogUFC/cm²). Coincidentemente con las otras determinaciones fenotípicas, la

mayor diversidad de respuestas en la acción del germicida se observan sobre las biopelículas generadas en polipropileno. Posiblemente esta variabilidad sea debida a la microtopografía del material, lo que genera que la biopelícula ahí instalada tenga mayor diversidad en cómo se conforma su estructura, posiblemente también este influenciada por la cantidad de SPE que las cepas tienen capacidad de generar. Pan *et al.* (2006) en estudios realizados con biopelículas de *Listeria monocytogenes* generadas sobre acero inoxidable y teflón, muestran resultado que sugieren que la resistencia de las biopelículas tratadas con AEN puede ser debido a las características y cantidad de las SPE y no a las características de resistencia intrínsecas de las células inmersas en la biopelícula.

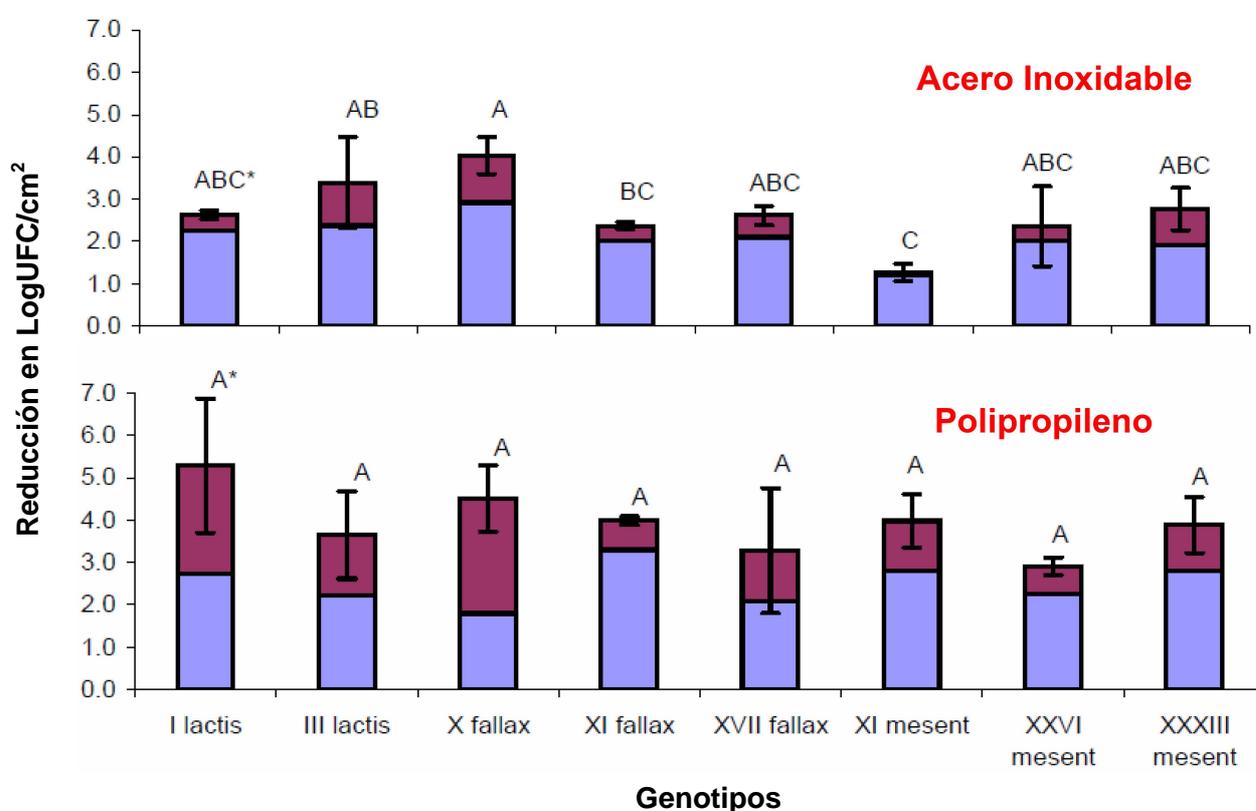


Figura 29. Efecto del AEN sobre células inmersas en biopelículas, de los genotipos de *Leuconostoc* con características críticas.

Sin embargo, el trabajar con mezcla de cepas resulta una limitante para evidenciar diversidad de respuestas, de las cepas de *Leuconostoc* con capacidad de formar biopelículas, ante el AEN. Para disipar esta restricción se decidió tratar individualmente todas las cepas que conformaban cada genotipo crítico. Así se apreció aún mejor una mayor diversidad de respuestas (Figura 30). La parte crítica de esta imagen radica en aquellas cepas sobre las que aun el germicida mejor no logra un efecto mayor a 1.2Log de UFC/cm², como es el caso de las cepas 43 y 44, que

pertenece al genotipo XI de *Lc. mesenteroides* aisladas de la superficie del cargador y de salchicha en empaque en agosto del 2008.

La mayor reducción independientemente del material de soporte se logró sobre las cepas de *Lc. lactis*. Este resultado es de importancia dado que en este grupo se encuentran las cepas que presentaron la mayor capacidad para formar biopelículas y las que fueron de mayor tamaño. Sin embargo, entre las cepas que componen esta especie hay mucha variabilidad de respuestas (2.20-4.54LogUFC/cm² en AI y de 2.98-5.83LogUFC/cm² en PP), lo que supone que algunas cepas son más resistentes que otras a ser eliminadas por acción del AEN.

La diversidad de estas respuestas representa un punto a considerar ya que evidencia que algunos individuos serán más difíciles de eliminar del proceso de producción, por lo que debe de implementarse una rotación programada de germicidas para evitar que cepas con similares características de resistencia a estas sean seleccionadas y se establezcan por tiempo indefinido en el equipo de producción.

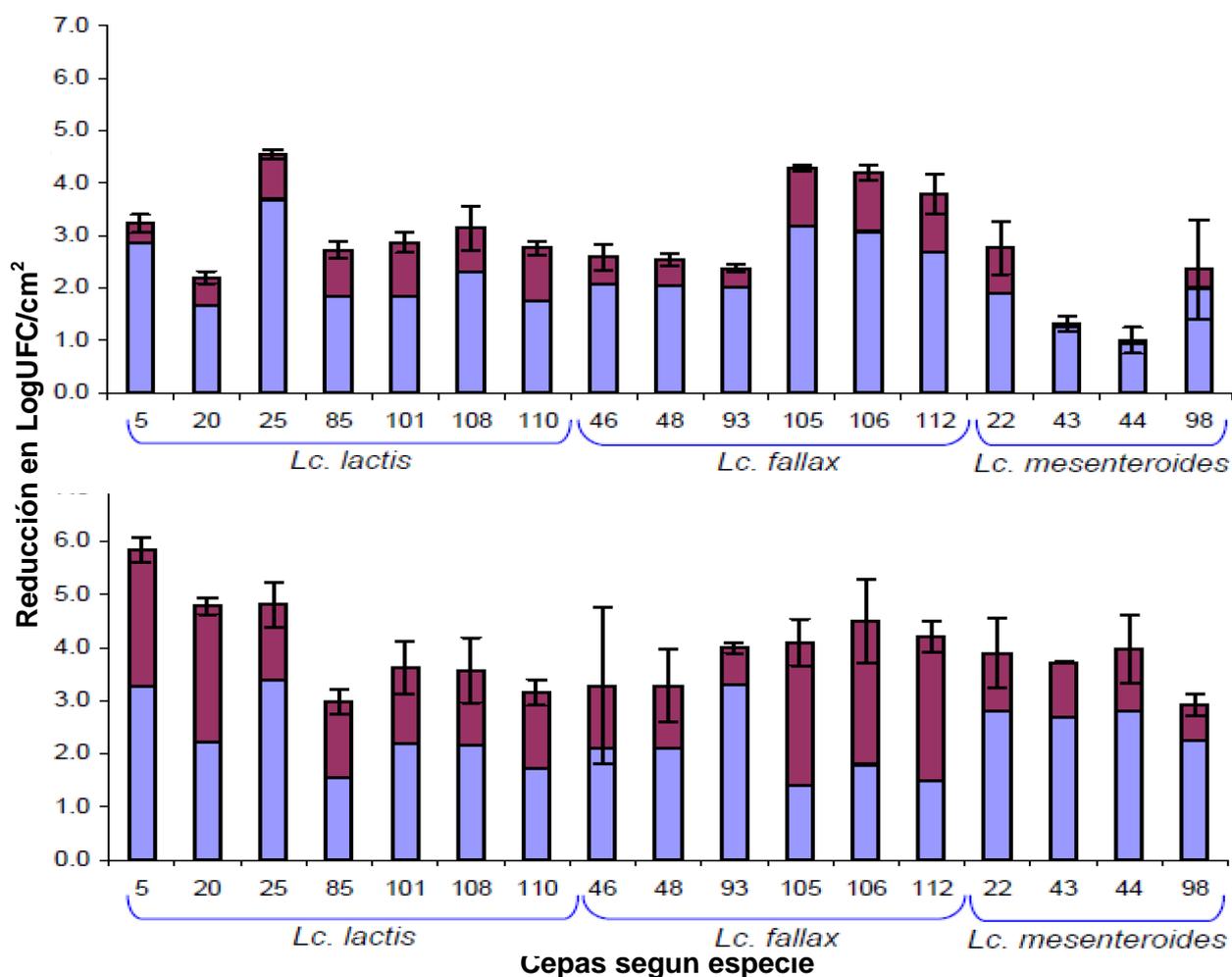


Figura 30. Efecto del AEN sobre células inmersas en biopelículas, de los genotipos de *Leuconostoc* con características críticas.

En general, la variabilidad en la reducción entre cepas de cada especie, por el efecto total del germicida al exponerse a AEN, fue: *Lc. lactis* > *Lc. fallax* ≈ *Lc. mesenteroides* (ver columna de desviación estándar en el Cuadro 12).

Cuadro 12. Diversidad de respuestas en las reducciones (LogUFC/cm²) por la acción del AEN, según material de soporte y especie de *Leuconostoc*.

Material de soporte	Especie	Reducciones por el EPG				Reducciones por el ETTG			
		Min	Max	Prom	Desv STD	Min	Max	Prom	Desv STD
Acero	<i>Lc. lactis</i>	1.67	3.69	2.68	2.02	2.20	4.54	3.37	2.35
	<i>Lc. fallax</i>	2.01	3.18	2.60	1.17	2.37	4.29	3.33	1.92
Inoxidable	<i>Lc. mesenteroides</i>	0.94	2.00	1.47	1.60	1.00	2.76	1.88	1.76
	<i>Lc. lactis</i>	1.55	3.38	2.46	1.82	2.98	5.83	4.41	2.85
Polipropileno	<i>Lc. fallax</i>	1.39	3.30	2.35	1.90	3.28	4.49	3.88	1.22
	<i>Lc. mesenteroides</i>	2.26	2.81	2.53	0.55	2.91	3.96	3.44	1.06

Donde: EPG: Efecto puro del germicida, ETTG: Efecto total del tratamiento germicida, Min: valor mínimo de reducción observado entre las cepas, Max: valor máximo, Prom: promedio, DesvSTD: desviación estándar (diferencia entre min y max).

La diversidad de las respuestas, tanto del efecto puro del germicida (EPF), como del efecto total del tratamiento germicida (ETT), se ve influenciada por la estructura biopelícula en el material de soporte (Figura 31).

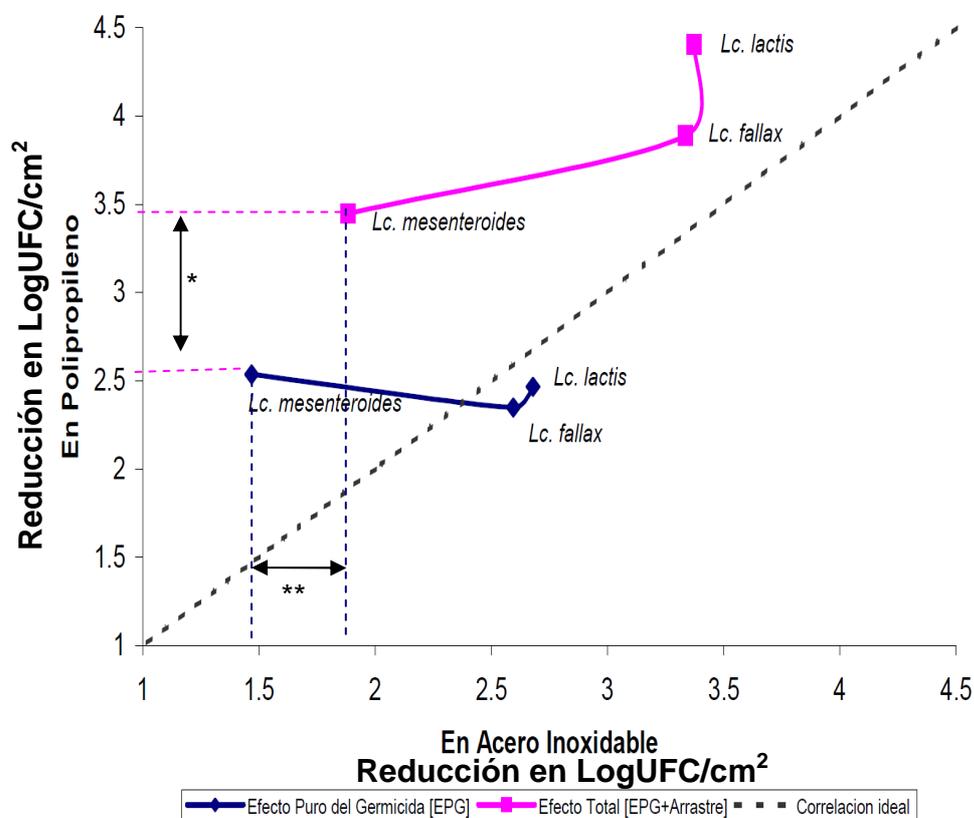


Figura 31. Relación entre el efecto del AEN sobre células de *Leuconostoc* inmersas en biopelículas en ambos materiales.

* Arrastre promedio en Polipropileno ** Arrastre promedio en Acero inoxidable

Observemos con atención a *Lc. mesenteroides* en la Figura 31, donde se muestra el efecto de arrastre (diferencia entre el ETTG y el EPG) del tratamiento sobre las biopelículas. En polipropileno la variabilidad de este efecto fluctúa entre 1.2 y 1.5 Log, sin embargo, en acero inoxidable varía desde 0.0021-1.3LogUFC/cm², es decir se observa una relación de la estructura que la biopelícula adquiere, con el material de soporte.

Por otro lado, el efecto de arrastre por un tratamiento germicida puede verse mermado por diversos factores, pero indudablemente el de mayor influencia es la estructura de la biopelícula. Esta estructura puede estar más o menos compactada dependiendo de la capacidad de formación de la biopelícula que tenga la cepa y evidentemente de la etapa de formación/maduración en que está se encuentre.

Para probar esta posible influencia de la etapa sobre el efecto del AEN, expusimos una mezcla de células del genotipo III de *Leuconostoc lactis*, por ser las de mayor potencial para formar biopelículas, desde sólo depositadas y adheridas y en diferentes etapas de formación del aglomerado.

En polipropileno, el AEN redujo 6.7, 5.4, 4.5, 2.8 LogUFC/cm² en células depositadas, adheridas, y después de 4 y 8 días de colonización, respectivamente. En acero inoxidable las cifras correspondientes fueron 5.4, 3.8, 3.6, 2.8 LogUFC/cm². En la Figura 32, se puede observar en verde la cinética de colonización de *Lc. lactis* en cada material y las barras muestran el EPG, el arrastre y el ETTG. De manera general podemos observar que la sola adherencia y la colonización a los materiales estudiados favorecen la sobrevivencia de *Leuconostoc* expuesto a AEN. Es necesario resaltar que después del cuarto día de colonización el efecto de arrastre es ya casi nulo en acero inoxidable y constante en polipropileno, en ambos materiales a partir de esta etapa ya fluctúa entre 0.0056-0.24LogUFC/cm².

Yang *et al.* (2009), encontraron resultados similares a los nuestros empleando 10 germicidas sobre biopelículas de *L. monocytogenes* de hasta 21 días desde su formación, concluyendo que la mayor eficiencia de los germicidas se observó cuando eran expuestos a etapas tempranas de la biopelícula (0-7 días) en comparación con etapas maduras (14 y 21 días). Ellos emplearon además cupones de polietileno de alta y baja densidad, encontrando que el efecto de reducción logarítmica (a partir de los 14 días desde su formación) fue mayor en biopelículas generadas en superficies lisas (P<0.05), que en superficies rugosas. Contrariamente, nosotros encontramos

mayores reducciones en superficies rugosas (polipropileno), que en superficies relativamente lisas (acero inoxidable). Sin embargo, no es absolutamente comparable dado que se ha reportado que las cargas electrostáticas de los materiales influyen en la adhesión y colonización de los microorganismos (Consternon *et al.*, 1995). Los materiales que nosotros empleamos, presentan diferentes propiedades: el polipropileno es hidrofóbico y el acero inoxidable hidrofílico (Thongyai *et al.*, 2005)

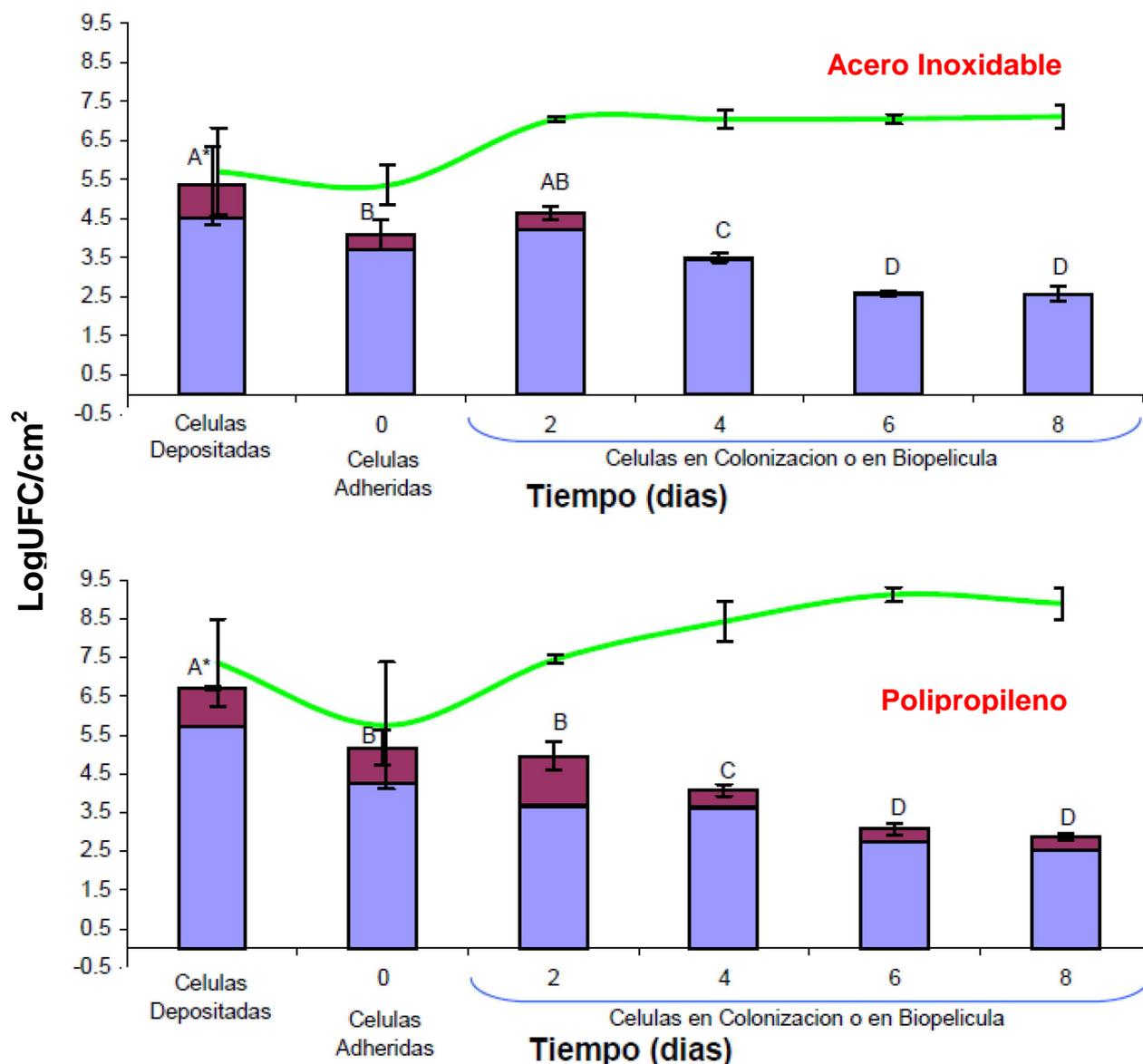


Figura 32. Efecto del AEN sobre *Leuconostoc lactis* (genotipo III) según etapas de formación de la biopelículas. En tinto el efecto de arrastre y en azul el efecto puro del germicida.

En la Figura 33 se muestran microfotografías de la superficie de acero inoxidable con células adheridas de *Lc. lactis*, que fueron expuestas a AEN. Se identificarán células rotas o lesionadas posiblemente por la acción del germicida. El mecanismo de acción del AEN contra las bacterias involucra: 1) una rápida reacción y

desnaturalización de las proteínas de membrana (Sharma, *et al.*, 2003); 2) los activos logran atravesar la membrana celular e introducirse a la célula en donde reaccionan y desnaturalizan las proteínas citoplasmáticas (Venkitanarayanan, *et al.*, 1999); 3) las especies reactivas oxidantes (ROS) reaccionan con los enlaces 1-4 de los lipopolisacáridos, en los grupos sulfidrilos (-SH) y aminoácidos de la pared bacteriana, con lo que se afecta el proceso de respiración y nutrición de los microorganismos, produciendo: oxidación de los componentes respiratorios, inhibición de la síntesis de proteínas y alteración en el metabolismo celular con disminución de la producción de fosfatos de alta energía ATP (adenosintrifosfato) (Morita, *et al.*, 2000); y finalmente, 4) como la osmolaridad es diferente entre la solución germicida y el citoplasma celular, el AEN induce la ruptura de la membrana provocando lisis celular (Nakajima, *et al.*, 2004).

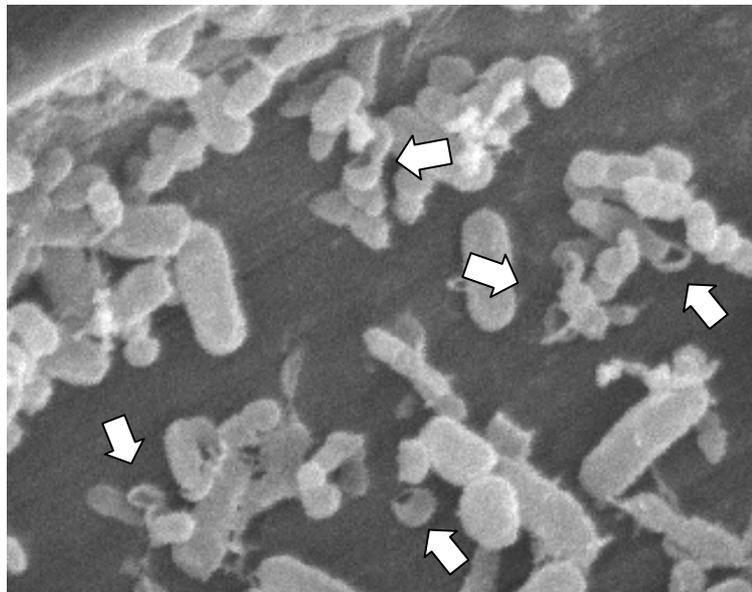


Figura 33. Superficie de acero inoxidable con células adheridas de *Lc. lactis*, que fueron expuestas por 5 min. a AEN. Las flechas indican células rotas o lesionadas.

Así mismo en la Figura 34, se muestran micrografías de superficies de polipropileno con *Lc. lactis* en colonización (4 días), la micrografía A muestra una biopelícula íntegra, como se han presentado con anterioridad en este documento, mientras que en la micrografía B sólo se observan evidencias de una biopelícula, ya que no es posible observar células inmersas en ella, sólo cavidades del tamaño de una célula, en las SPE.

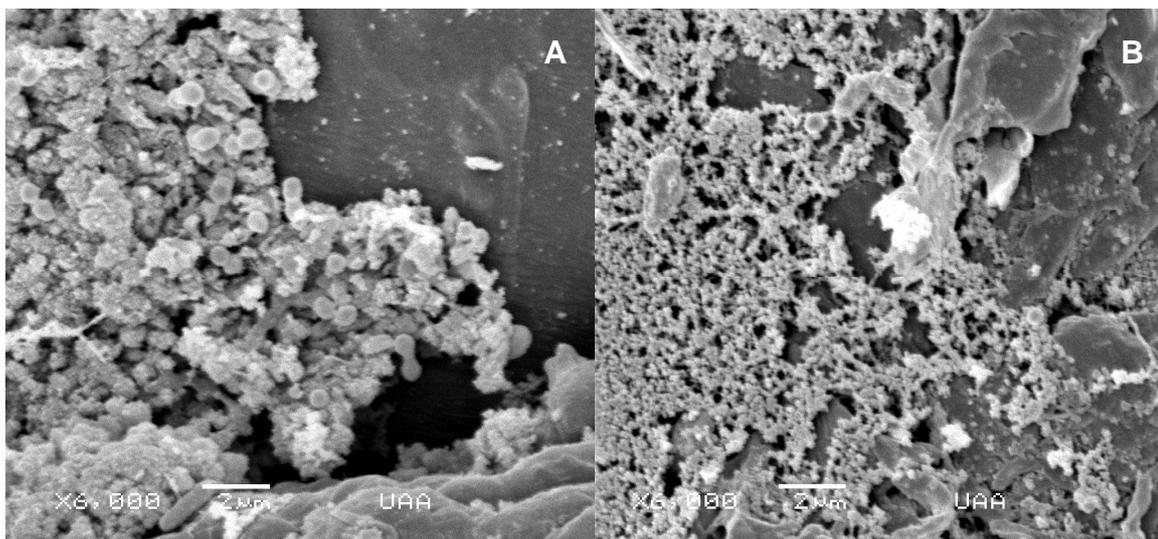


Figura 34. Micrografías de superficies de polipropileno con *Lc. lactis* en colonización (4 días).
A. Biopelícula sin germicida B. Biopelícula expuesta a AEN.

El control microbiano y la eliminación de las biopelículas son objetivos primordiales para prevenir el deterioro de las salchichas y asegurar que se cumplen las especificaciones de calidad de los mismos. Sin embargo, hemos evidenciado que también influye la susceptibilidad particular de cada cepa, sobre la posibilidad de lograr estos objetivos.

La aplicación de germicidas sobre el equipo de producción es una de las medidas de corrección adecuadas para eliminar los reservorios de contaminación. Sin embargo, los medios más importantes para el mantenimiento de un control microbiano eficiente incluye minimizar la carga microbiana de otras fuentes del proceso, como es el caso de la materia prima, control eficiente del desarrollo microbiano en lugares vulnerables dada sus condiciones ambientales y finalmente, eficientar la limpieza y desinfección continua en las líneas de producción.

Actualmente se conoce para otros microorganismos, que las SPE son el blanco a eliminar, cuando se enfrentan con el objetivo de eliminar biopelículas con agentes germicidas. Por todo ello no es de extrañar el afán incesante de las industrias químicas para lograr sacar al mercado el desinfectante ideal que asegure la eliminación de las biopelículas, concretamente la matriz de exopolímeros que embebe a los microorganismos. Sin embargo, la eliminación de estos compuestos en la mayoría de las veces involucra la aplicación de enzimas con una acción muy específica, y evidentemente esto sugiere que el producto ideal adquiera un costo elevado.

En la industria, generalmente importan más los costos económicos de la solución a sus problemas, que la posibilidad de cancelar el problema.

Adicionalmente al problema que representan la baja eficiencia de los germicidas sobre las biopelículas microbianas, debido a la gran diversidad de factores que influyen en esta, se suma el que sus equipos de producción no han sido diseñados para permitir el lavado y de desinfección adecuado de sus componentes. Y evidentemente el sustituir sus equipos, aparte del gran costo económico que requeriría, el diseño involucraría una sólida combinación de ingeniería mecánica y conocimientos microbiológicos. Idealmente este grupo multidisciplinario debiera adoptar desde la fase inicial de desarrollo de los equipos, los requisitos higiénicos necesarios, sin embargo, frecuentemente esto resulta caro y por ende falta de éxito en su comercialización.

En cualquier situación, la eliminación de la biopelícula es una tarea muy difícil y exigente que puede resultar sumamente cara, poco realista incluso, sin embargo, conociendo las características de la flora con potencial para formar la biopelícula, podría facilitar la posibilidad de controlar al microorganismo evitando su instalación en los equipos de producción.

8. CONCLUSIONES

La técnica de RAPD empleada para la genotipificación de cepas de *Leuconostoc* permitió identificar diferencias inter- e intraespecie.

La diversidad genética entre las cepas de *Leuconostoc*, de acuerdo al número de genotipos fue: *Lc. mesenteroides* > *Lc. fallax* > *Lc. lactis* > *Lc. plantarum*

El modelo de esferas para evaluar adhesión, colonización y formación de biopelículas sobre materiales inertes, ofrece ventajas en costo, tiempo y espacio con respecto al modelo de placas.

Las cepas de *Leuconostoc* spp. mostraron mayor capacidad de adhesión, colonización y formación de biopelículas en superficies de polipropileno, que en las de acero inoxidable. Sin embargo, las biopelículas formadas en polipropileno muestran una estructura menos compacta que permite mayor liberación de las células por arrastre.

La diversidad en la capacidad de adhesión de las cepas de *Leuconostoc* en polipropileno fue superior con respecto a acero inoxidable. En contraste, los parámetros cinéticos en ambos materiales mostraron una diversidad similar.

En orden decreciente el tamaño de la biopelícula generada por *Leuconostoc* (72 h de colonización), evaluado mediante MEB fue: *Lc. lactis* > *Lc. mesenteroides* \approx *Lc. fallax* > *Lc. plantarum*

Dado que existen genotipos que muestran permanencia en el tiempo (hasta por dos años) y que tienen gran capacidad de adhesión y colonización, se sugiere la existencia de reservorios de *Leuconostoc* spp. en la empresa, formando biopelículas en los equipos de producción.

Se identificó una asociación entre la cantidad de bandas observadas en el perfil genético de las cepas de *Leuconostoc* spp. obtenido mediante RAPD y su capacidad para adhesión a polipropileno y acero inoxidable.

Grupos de genotipos (>54% similitud) de *Lc. fallax* y *Lc. lactis* mostraron una asociación con la velocidad de desarrollo y la población máxima alcanzada durante la colonización, en ambos materiales.

La eficiencia de los germicidas para inactivar *Leuconostoc* spp. en la biopelícula, en orden decreciente fue: agua electrolizada neutra (428ppmCl⁻/1086mV de Eh) > ácido peroxiacético (80ppm) > cloro (200ppm) > sales cuaternarias de amonio (150ppm).

La adherencia y la colonización a los materiales estudiados favorecen la sobrevivencia de *Leuconostoc* expuesto a agua electrolizada neutra.

9. REFERENCIAS CITADAS

- ANTAD (2007). Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales. Por Llamas-Olaran, J. M. Recuperado en Agosto del 2009. Disponible en <http://antad.org.mx/articulos/salchichas.pdf>
- Arevalos-Sanchez, M. M., García-Almendarez, B., Regalado, C. (2010) Efecto del Agua Electrolizada y Nisina sobre Biopelículas de *L. monocytogenes* Formadas sobre Acero Inoxidable y Vidrio. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Barajas-Vega, H. A., Reynoso-Camacho, R. (2010). Alimentación Alta en Grasa Saturada Durante Etapas Tempranas de Crecimiento como Factor de Riesgo para el Desarrollo de Alteraciones Renales. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Barbara-Vu, Miao Chen, Russell J. Crawford and Elena P. Ivanova, (2009). Review: Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules*, 14: 2535-2554
- Barboza-Corona, J. E. y Escudero-Abarca, B. I. (2002). Como usar una bacteria para combatir plagas y hongos. *Ciencia*. 53 (3): 76-83
- Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Salcedo-Hernández, R., Bautista-Justo, M. (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*, septiembre-diciembre. 32-38
- Barquera, S., Tolentino, L., Rivera-Domarco, J. (2005). El consumo de alimentos en México. Sobrepeso y Obesidad. 1ra. Edición. México. Instituto Nacional de Salud Pública. 59-66
- Barrett, T. J., P. Gerner-Smidt, and B. Swaminathan. (2006). Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog. Dis.* 3:20-31
- Barrett, T. J., Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens Dis* 3: 59–67

- Bearson, S., B. Bearson and J. W. Foster. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147:173-180
- Björkroth, K.J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W.H., Korkeala, H.J. and Vandamme, P. (2000). Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified atmosphere conditions. *Appl Environ Microbiol.* 66:3764–3772
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L. and Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol.* 33:103–120
- Buchanan, R. L. (1986). Processed meats as a microbial environment. *Food Technol.* 40:134-139
- Buchanan, R. L., (1993). Predictive food microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* 4:6-11
- Buchanan, R. L., Whiting, R. C. (1996). Risk assessment and predictive microbiology. *J, Food Prot. Suppl.* 31-36
- Call DR, Bakko MK, Krug MJ, Roberts MC. (2003). Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3290–5.
- Carpentier B and O Cerf. (1993). Review. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 75: 499-511.
- Cepeda-Márquez, L., Ramirez-Barrera G., Arvizu-Medrano, S. M., Fernandez-Escartín, E. (2008). Reservorios de *Leuconostoc* en una planta procesadora de salchichas. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria 2008. Memorias del congreso, sección D.
- Cepeda-Márquez, L., Arvizu-Medrano, S. M., Fernandez-Escartín, E. (2009). Detección de fuentes de contaminación e inactivación de *Leuconostoc* spp. en salchicha Viena en una planta procesadora. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- CFSAN/FDA (2001). Center for Food Safety and Applied Nutrition. Food and Drug Administration. Sanitizers and detergents by Surfaces of utensils and equipment contacting potentially hazardous food. Recuperado en Agosto del 2009. Disponible en <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fc01-sup.html>

- Chapman JS. (1998). Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. *Intl Biodeter Biodegrad* 41:241-5.
- Chenoll E, Macián MC, P. Elizaquível, Aznar R. (2007). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. The Society for Applied Microbiology. *J. of Appl. Microbiol.* 102:498–508
- Cloete TE. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Intl Biodeter Biodegrad* 51:277–82.
- Comisión del Codex Alimentarius. (1995). Código internacional recomendado de prácticas de higiene para los alimentos precocinados y cocinados utilizados en los servicios de comidas para colectividades (CAC/RCP-39-1993). Volumen 1B, Codex Alimentarius. FAO/OMS, Roma.
- Costerton, J. W., K.J. Cheng G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, m. Dasgupta, and T. J. Marrie. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435-464
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial Biofilms. *Ann.I Rev. Microbiol.* 49:711-745
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* 284;1318-1322.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112:1466-1477
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280: 295-298.
- Dever LA, Dermody TS. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Intern Med* 151:886–95.
- Donlan RM and JW Costerton. 2002. Review. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881-890.

- Dowell, Robin D., Owen Ryan, An Jansen, Doris Cheung, Sudeep Agarwala, Timothy Danford, Douglas A. Bernstein, P. Alexander Rolfe, Lawrence E. Heisler, Brian Chin, Corey Nislow, Guri Giaever, Patrick C. Phillips, Gerald R. Fink, David K. Gifford, Charles Boone (2010). "Genotype to phenotype: a complex problem". *Science* 328 (5977) 469:479
- Draughon, F. A. (2004). Use of botanical as biopreservatives in food. *Food Technol.* 58(2):20-28
- Dunne WM Jr. 2002. Review. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15: 155-166.
- Escudero-Abarca, B. I., Sanchez Esquivel, S. (2002). Bacteriocinas de bacterias lácticas: biosíntesis y transporte. *Revista de Educación Bioquímica.* 21(1):12-20
- FAO, (1996). La utilización de los principios de análisis de riesgos y de los puntos críticos de control en el control de los alimentos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición 58, Roma, Italia.
- FAO/WHO (1986). Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Guidanse to governments on the application of HACCP in small and/or less-developed food businesses.
- Fernandez-Escartin, E. (2009). Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Segunda edición. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Flemming H-C. 2002. Mini-review. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 629-640.
- Gagnon G., Slawson R. (1999). An efficient biofilm removal method for bacterial cell exposed to drinking water. *J. of Microbiol Meth*, (34):199-204.
- Gerneau, S., Martin N.I. and Vederas J. C. (2002). Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 84:577-592
- Getz, S., D. W. Fulbright, and C. T. Stephens. (1983). Scannig electron microscopy of infection sites and lesion development on tomato fruit infected whit *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*. *Phytopathology.* 73:39-43
- Giancarlo-Moschetti., Blaiotta, G., Villani, F., Coppola, S. (2000). Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* with DNA primers identified

- by Randomly Amplified polymorphic DNA Analysis, *Appl Environ Microbiol.* 66(1):422-424
- Goering, R. V. (1993). Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 14:595-600
- Goering, R. V. (2000). The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Rev. Med. Microbiol.* 11(3):145-152
- Hamilton W.A. (1993). "Industrial Problems Due to Biofilms, Bacterial Biofilms and their Control in Medicine and Industry". Inaugural Meeting of the British Biofilm Club held at Gregynog Hall, p. 109-111
- Harrison, Joe J.; Turner, Raymond J.; Marques, Lyriam L.R. y Ceri, Howard. 2004. Biopelículas. *Revista Investigación y Ciencia.* Marzo-06: 354
- Hernández-Hernández, O., Arvizu-Medrano., S. M. (2010). Efecto de la Humedad Relativa y la Cantidad de Nutrientes sobre la Colonización de *Leuconostoc mesenteroides* en Polipropileno. Memorias del Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria. Universidad Autónoma de Querétaro. C-14, Pag. 45
- Hernandez-Iturriaga Montserrat., E. Fernandez-Escartín, L. R. Beuchat and R. Martínez-Peniche. (2003). Effect of inoculum size, relative humidity, storage temperature, and ripening stage on the attachment of *Salmonella* Montevideo to tomatoes and tomatillos. *J. Food Prot.* 66:1756-1761
- Hilton A.C. and Banks J.G. and Penn C.W. 1997. Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*. *Lett in Appl Microbiol*; 24:243-248
- Hinton, A. Jr., Northcutt, J. K., Smith, D. P., Musgrove, M. T., Ingram, K. D. (2007). Spoilage Microflora of Broiler Carcasses Washed with Electrolyzed Oxidizing or Chlorinated Water Using an Inside-Outside Bird Washer. *Poult. Sci.* 86: 123-127
- Hua-Yang., Kendall, P. A., Medeiros, L. C., Sofos, J. N. (2009). Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on high density polyethylene cutting board surfaces, *J. Food Protect.* 72(5):990-998
- INEGI (2008) Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Boletín de Información Oportuna del Sector Alimentario. Número 282. Recuperado en Agosto del 2009. Agosto del 2009. Disponible en http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sectorial/biosa/biosa.pdf

- Jessen B, Lammert L., (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *Int Biodet*, 51(4): 265-269.
- Kilic, Abdullah, Bedir, O., Kocak, N., Levent, B., Polat Eyigun, C., Faruk Tekbas, O., Levent Gorenek, O., Baylan, O. and Celal Basustaoglu, A. (2010). Analysis of an Outbreak of *Salmonella Enteritidis* by Repetitive-Sequence-Based PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Internal Medicine*, 49: 31-36
- Korkeala, H., J. Alanko, P. Makela & S. Lindroth. (1990). Lactic acid and pH as indicators of spoilage for vacuum-packed cooked ring sausages. *Internat J. Food Microbiol.* 10:245–253
- Kim, C., Hung, Y.C., Brachett, R. E. (2000). Efficacy of electrolyzed oxidizing (EO) and chemically modified water on different types of foodborne pathogens. *Internat J. Food Microbiol.* 61:199-207.
- Korkeala, H. J., Bjoörkroth, K. J., P. Vandamme. (1998). Identification and Characterization of *Leuconostoc carnosum*, Associated with Production and Spoilage of Vacuum-Packaged, Sliced, Cooked Ham. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3313–3319
- Madigan, M.T.; J.M. Martinko; J. Parker. (2004). Brock Biology of Microorganisms. 10th edition, Prentice Hall.
- Maslow, J. N., Ellis, M. M., Arbeit, R. (1993). Molecular epidemiology: application of temporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis.* 17:153-164
- Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165-199.
- Monchois, V., Willemot, R. M., Remaud-Simeon, M., Croux, C., Monsan, P. (1996). Cloning and sequencing of a gene for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B-1299 synthesizing only $\alpha(1\rightarrow6)$ and $\alpha(1\rightarrow3)$ linkages. *Gene.* 182:23–32.
- NMX-F-065-1984. Norma Mexicana de Observacion Voluntaria. Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Foods. Sausage. Specifications. Dirección general de Normas.

- Morita C, Sano K, Morimatsu S, Kiura H, Goto T., (2000). Disinfection potential of electrolyzed solution containing sodium chloride at low concentrations. *J Virol Methods* 2000; 85: 163-174.
- NOM-002-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Productos preenvasados contenido neto tolerancias y métodos de verificación.
- NOM-051-SCFI-1994. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.
- NOM-122-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.
- NOM-194-SSA1-2004. Norma Oficial Mexicana. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
- NOM-213-SSA1-2002. Norma Oficial Mexicana. Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Nuttha Thongyai, Siriporn Daowphiset y Narong Pungwiwat (2005), Study of Stainless Steel Surface Cleanability. Metal Technologys Seminary-S04. Recuperado el día 17 de octubre de 2010, de <http://www2.mtec.or.th/th/seminar/msativ/pdf/S04.pdf>
- Olsen J.E., Brown, D.J., Skov, M.N. and Christensen J.P. 1993. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Veter. Quarter*; 15(4):125-134.
- Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ and Brown DJ. 1994. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulse field gel electrophoresis and RFLP typing. *J. Med. Microbiol*;40(1):15-22..
- Östling, C. E., and S. E. Lindgren. (1993). Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. *J. Appl. Bacteriol.* 75:18-24
- O'Toole G, HB Kaplan and R Kolter. 2000. Review. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49-79.

- Pan Y, Breidt F Jr, Kathariou S. (2006), Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl Environ Microbiol.* 72(12):7711-7717
- Park, C. M. and L. R. Beuchat. (1999). Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. *Dairy, Food Environ. Sanitat.* 19: 842-847.
- PROFECO (2005). Procuraduría Federal del Consumidor. Laboratorio Nacional de Protección al Consumidor, Revista de protección al consumidor. Recuperado en Agosto del 2009. Disponible en www.profeco.gob.mx y en http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_05/salchicha_ene05.pdf
- Riley, M. A. and Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie.* 84:357-364.
- Rivas, M., Seeger, M., Holmes, D.S., Jedlicki, E. (2005). A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Res.* 38:283-297.
- Rodríguez-Palenzuela. (2006). Mecanismo de acción de los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos. XVI Curso de Especialización FEDNA. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Madrid.
- Roe MT, Pillai SD. (2003). Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. *Poult Sci* 82:622–6.
- Ruiz, L.M.; Valenzuela, S., Castro, M., Gonzalez, A., Frezza, M., Soulère, L., Rohwerder, T., Queneau, Y., Doutheau, A., Sand, W., Jerez, C.A., Guiliani, N. (2008). AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy*, 94:133-137.
- Russell AD. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J Appl Bacteriol* 71:191–201.
- Russell AD. (1997). Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J Appl Microbiol* 83(2):155–165.

- Russell AD, Chopra I. (1996). Understanding antibacterial action and resistance, 2nd ed. London: Ellis Horwood.
- Sambrook, J., Russell, D.W., Maniatics., (2001). Molecular Cloning. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Swaminathan B, Barret TJ, Hunter SB, Tauxe RV; The CDC PulseNet Task Force. (2001). PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect. Dis.* 2001;7(3):382-9.
- Savitri-Vatanyoopaisarn, (1998), Comparison of Detachment Methods for Biofilm Removal on Glass and Stainless Steel Surfaces, *J Appl Microbiol* 89(3):154–162.
- Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H. and Björkroth, J. (2005). Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”. *Int J Food Microbiol.* 97:285–296.
- Saunders, G. C., Juliet, D., Helen, C. P., y Johanne, H. C. (2001). Interlaboratory Study on Thermal Cycler Performance in Controlled PCR and Random. Amplified Polymorphic DNA Analyses. *Clinical Chemistry.* 47(1):47–55
- Savelkoul, P. H. M., Arrts, H. J. M., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L. W., Schouls, L., y Lenstra, J. A. (1999). Ampified-Fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol.* 37(10):3083-3091.
- Savell, J. W., Acuff G., Griffin, D. (2000). Rosenthal HACCP plans. Fully Cooked, Not-Shelf-Stable: Cured Sausage Products HACCP Plan, Department of Animal Science Texas A&M University, College Station, Texas, Recuperado en Julio del 2009. Disponible en <http://meat.tamu.edu/HACCP/sausage.pdf>
- Scott, V.N. and Taylor, S.L. (1981 a). Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.* 46:117-122
- Scott, V.N. and Taylor, S.L. (1981 b). Temperature, pH and spore load effects on the ability of nisin to prevents outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.* 46:121-130
- Scott, M. Holt, and Gregory L. Cote. (1998). Differentiation of Dextran-Producing *Leuconostoc* Strains by a Modified Randomly Amplified Polymorphic DNA Protocol. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(8):3096-3098

- Scott, M. T., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah, and J. Lukasik (2002). Microbial source tracking; current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5796-5803
- Sharma RR., Demirci A. (2003). Treatment of Escherichia coli O157:H7 inoculated alfalfa seeds and sprouts with electrolyzed oxidizing water. *Int J Food Microbiol.* 2003; 86: 231-237.
- Silva Sónia, Teixeira Pilar, Olviera Rosario, y Joana Azaredo (2008),. Adhesion and Viability of *Listeria monocytogenes* on Food Contact Surfaces. *J. of Food Protect.* 71:1379-1385
- Stoodley P, K Sauer, DG Davies and JW Costerton. 2002. Review. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209.
- Struelens, J., y Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (MESGEM). (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol. Infect.* 2(1):2-11
- Struelens, M. (1998). Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: Current issues and perspectives.
- Struelens, M. (2001). Molecular epidemiology. Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections. Marcel Dekker, Inc. New York. 125-145
- Tenover, F. C., Arbeit, R., Archer, G, et al. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 32:407-415
- Tenover, F. C., Robert, D. A., Goering, R. V., Patricia A. M., Barbara E. M., David H P., y Bala S. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9):2233-2239
- Tenover, F. C., Robert D. A., Goering, R. V., y the Molecular Typing Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 18(6):426-439
- Tenover F., Arbeit R. and Goering R. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A

review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp. Epidemiol.*; 18(6): 426-439

Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Jerez, C.A. (2006). Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 24: 197-211.

Van Belkum, A., Struelens, M., De Visser A., Verbrugh H and Tibayrenc M. 2001. Rol of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics and Microbial Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3):547-560.

Venkitanarayanan, Kumar S. Ezeike, Gabriel O. Hung, Yen-Con and Doyle, Michael P. (1999). Efficacy of Electrolyzed Oxidizing Water for Inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytógenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9):4276-4279.

Vihavainen, Elina J., Murros, Anna E., Björkroth, K. J., (2008). *Leuconostoc* Spoilage of Vacuum-Packaged Vegetable Sausages. *J Food Protect*, 71(11):2312-2315

Vogel L., Van Oorschot E, Maas HM, Minderhoud B., and DijkshoornL. 2000. Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, ribotyping and serotyping. *Clin Microbiol Infect*;6:82-7..

Von Holy, A., W. H. Holzapfel., G. A. Dykes. (1992). Bacterial populations associated with Vienna sausage Packaging, *Int J Food Microbiol.* 9:45-53

Warner, J. E. y Onderdonk, A. B. (2003). Method for Optimizing Pulsed-Field Gel Electrophoresis Banding Pattern Data. *J. Molec. Diagn.* 5(1):21-27

Waters, C.M., Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:319-346.

Welinder-Olsson C., Kjellin E., Badenfors M., Kaijser B. 2000. Improved microbiological techniques using the polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for a diagnosis and follow-up of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Europ. J. of Clin. Microbiol. Infect. Dis*;19(11):843-51

Wimpenny, J. W. T., S. L. Kinniment, and M. A. Scourfield, (1993). The physiology and biochemistry of biofilm. Microbial biofilm: Formation and control. *Soc. Applied Bacteriol. Technic. Series.* 30: 51-94.

- Yang H, Kendall PA, Medeiros LC, Sofos JN. (2009), Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on high-density polyethylene cutting board surfaces. *J. of Food Protect.* 72(5):990-998
- Yost, C.K. and Nattress, F.M. (2002). Molecular typing techniques to characterize the development of a lactic acid bacteria community on vacuum-packaged beef. *Int. J. Food. Microbiol.* 72:97–105.
- Yousef AE, Juneja VK. 2003. eds. Microbial stress adaptation and food safety. Boca Raton, Fla.: *CRC Press.* 369 p.
- Yu X, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. 2004. Development and validation of a diagnostic DNA microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* among clinical isolates. *J. Clin Microbiol* 42:4083–91