



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Efecto de las Nanopartículas de plata sobre la formación de biofilms y presencia de los genes *inIA*, *inIB* y *luxS* en *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos y lácteos.

T E S I S

(Idónea comunicación de resultados)

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS

PRESENTA

M.V.Z. Suzette Juárez Contreras

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dr. Francisco Héctor Chamorro Ramírez

Co-director:

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

Asesora:

M.C. Dulce María González López

Ciudad de México, septiembre de 2023



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Ciudad de México, México a 06 de septiembre de 2023

**COMISIÓN ACADÉMICA DE LA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Presente

Por este conducto tengo el placer de comunicarle que he revisado y aprobado el documento de la Idónea Comunicación de Resultados del proyecto de investigación titulado **"Efecto de las Nanopartículas de plata sobre la formación de biofilms y presencia de los genes *inIA*, *inIB* y *luxS* en *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos y lácteos"** el cual fue elaborado por la **MVZ. Suzette Juárez Contreras**, con matrícula **2212801951**. Se han cumplido los objetivos propuestos y dicho documento posee la calidad y elementos suficientes para ser evaluado y en su caso aprobado por el jurado de examen de grado que se nombre para tal efecto.

Sin más por el momento quedo a sus órdenes.

ATENTAMENTE

Dr. Francisco Héctor Chamorro Ramírez
No. Económico 32000.
Director.

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez
No. Económico 8757
Codirector.

M.C. Dulce María González López
No. Económico 44834
Asesora.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Francisco Héctor Chamorro Ramírez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Profesor Investigador Titular "C"

CO-DIRECTOR

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Atención a la Salud

Profesor Investigador Titular "C"

ASESORA

M.C. Dulce María González López

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Profesora Investigadora

Jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana para la tesis titulada:

“Efecto de las Nanopartículas de plata sobre la formación de biofilms y presencia de los genes *inIA*, *inIB* y *luxS* en *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos y lácteos”.

Que presentó:

M.V.Z. Suzette Juárez Contreras

JURADO DEL EXAMEN

PRESIDENTE

Dra. Aida Hamdan Partida

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
DCBS, Departamento de Atención a la Salud, Profesor Titular “C”

SECRETARIO

Dra. Beatriz Sofía Schettino Bermudez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
DCBS, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Profesor Titular “A”

VOCAL

M.C. Dulce María González López

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
DCBS, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Profesor Investigador

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y a la Maestría en Ciencias Agropecuarias por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) México, por el apoyo económico brindado a través de la beca (CVU: 1143817).

A mi director de tesis, el Dr. Francisco Héctor Chamorro Ramírez por haber confiado en mí, por haberme acompañado desde la licenciatura, mi servicio social y por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación en la Maestría en Ciencias Agropecuarias. Gracias a su paciencia, persistencia y motivación es que eh logrado culminar esta etapa. Lo aprecio y le guardo mucho cariño, respeto y admiración.

Al Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez y a la M. C. Dulce María González López, agradezco que hayan sido parte fundamental de mi comité tutorial, gracias por el tiempo que siempre me dedicaron para apoyarme y aconsejarme, y que de este modo se lograra completar cada uno de los objetivos de este proyecto. Gracias por haber depositado su confianza en mí.

A la Dra. Aida Hamdan Partida y al Dr. Samuel González García, por haberme apoyado y asesorado en la parte experimental de mi trabajo, gracias por su tiempo.

A la Dra. Esmeralda Mónica Peña González le doy las gracias porque siempre tuvo una palabra de aliento para mí, siempre me motivó a continuar a pesar de que el camino podía parecer difícil. Gracias por preocuparse por mí en todo momento y principalmente, gracias por su amistad y cariño.

Al Laboratorio N-106-Farmacia Molecular y Liberación Controlada, del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X, en especial al Dr. Abraham Faustino por el apoyo especializado en la realización del Análisis de Tamaño de Partícula de mis soluciones de AgNPs.

Al Laboratorio G-303, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-X, en especial a la Dra. Lucía Ortega Cabello, por el apoyo especializado en el Análisis de Espectrofotometría por Transformada de Fourier de mis soluciones de AgNPs.

GRACIAS...

DEDICATORIA

A mis padres Leonor Contreras Santos y Clemente Juárez Arizmendi que son piezas fundamentales e indispensables en mi vida. Les agradezco enormemente por apoyar mis decisiones y por siempre confiar en mí en cada paso que he dado para cumplir mis objetivos profesionales. Gracias a su amor infinito, comprensión y por escucharme y brindarme apoyo para no darme por vencida jamás.

A mi hermana la Dra. Sayuri Juárez Contreras por siempre estar al pendiente de mí brindándome apoyo y sabiduría. Gracias por aplaudir mis logros y por sentirte feliz con los pasos que he dado; estoy segura de que ambas lograremos nuestros objetivos profesionales, hermanita.

A mi mejor amigo, el MVZ. Juan Pablo Pérez por hacerme reír y compartir momentos especiales conmigo. Pero sobre todo por ayudarme siempre que lo requiero, por escucharme, aconsejarme, por motivarme en aquellos momentos difíciles y hacerme saber que soy capaz de realizar todo lo que me proponga, gracias.

A mi amiga y compañera Elis Regina Rosales, porque caminamos juntas en este trayecto de la maestría de inicio a fin. No pude tener a una mejor compañera para vivir los momentos bonitos y a veces difíciles de la maestría, contigo todo fue mejor.

A mis compañeras a quienes conocí en el Laboratorio Veterinario de Ciencia de la Carne y Salud Pública. Que ahora considero mis amigas e hicieron mi estancia más plena y feliz: Liliana de la Luz Morales, Ana Iris Rodríguez y Cynthia Susana González, gracias por ser tan bellas personas.

A Tomasito, mi compañero de vida que es una pieza fundamental, y por quien me esfuerzo todos los días. Porque fue quien me acompañó en mis noches de desvelo mientras escribía mis trabajos y estudiaba, gracias bebé.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. ABSTRACT.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
3. MARCO REFERENCIAL.....	12
3.1. Consumo de productos cárnicos y lácteos.....	12
3.2. Contaminación bacteriana de productos cárnicos y lácteos	12
3.3. <i>Listeria monocytogenes</i> causante de enfermedad transmitida por alimentos	14
4. MARCO TEÓRICO	17
4.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	17
4.1.2. Generalidades y morfología de <i>L. monocytogenes</i>	19
4.1.3. Capacidad para formar biofilms	20
4.1.4. Condiciones que influyen en la formación de biofilms.....	21
4.1.5. Dinámica de formación de biofilms.....	23
4.1.6. Regulación dentro del biofilm: <i>Quórum sensing</i>	26
4.1.7. Genes implicados en la formación de biofilms	28
4.2. Ingreso y persistencia de <i>L. monocytogenes</i> en la industria alimentaria	29
4.3. Métodos de control de biofilms de <i>L. monocytogenes</i>	30
4.4. Nanopartículas de plata.....	31
4.4.1. Síntesis de AgNPs.....	32
4.4.2. Caracterización de AgNPs	33
4.4.3. Mecanismo de acción de las AgNPs en biofilms.....	34
4.4.4. AgNPs contra <i>L. monocytogenes</i>	36
5. JUSTIFICACIÓN	36
6. HIPÓTESIS	36
7. OBJETIVOS.....	37
7.1. General	37
7.2. Específicos.....	37
8. MATERIAL Y MÉTODOS	37
8.1. Obtención de muestras de productos cárnicos y lácteos	37
8.2. Aislamiento e identificación de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	38
8.2.1. Aislamiento de colonias presuntivas a <i>Listeria</i>	38
8.2.2. Identificación macroscópica, microscópica y bioquímica.....	39

8.2.3. Identificación molecular de cepas de <i>L. monocytogenes</i> por amplificación del gen 16S rRNA.....	41
8.3. Síntesis de AgNPs.....	44
8.3.1. Caracterización de AgNPs	44
8.4. Determinación del efecto antimicrobiano de las AgNPs	45
8.5. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> 47	
8.6. Evaluación del efecto de AgNPs en los biofilms de <i>L. monocytogenes</i>	48
8.7. Identificación de genes de formación de biofilm en <i>L. monocytogenes</i>	52
8.7.1. Amplificación de los genes <i>inIA</i> , <i>inIB</i> y <i>luxS</i>	52
8.8. Análisis estadístico.....	54
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
9.1. Aislamiento e identificación de <i>L. monocytogenes</i> a partir de productos cárnicos y lácteos	55
9.2. Capacidad de formación de biofilms	61
9.3. Caracterización de AgNPs	63
9.4. Determinación del efecto antimicrobiano de las AgNPs	67
9.5. Efecto de las AgNPs sobre los biofilms de <i>L. monocytogenes</i>	72
9.6. Presencia de genes de formación de biofilms: <i>inIA</i> , <i>inIB</i> y <i>luxS</i>	75

1. RESUMEN

La importancia de controlar biofilms de *Listeria monocytogenes* en superficies de contacto con alimentos, han llevado a la búsqueda de agentes para su eliminación. Las nanopartículas de plata (AgNPs) podrían ser una estrategia pues poseen propiedades antimicrobianas. El objetivo fue determinar el efecto de AgNPs sobre formación de biofilms de *L. monocytogenes* aislada de productos cárnicos y lácteos, e identificar la presencia de los genes *inIA*, *inIB* y *luxS* involucrados en la formación de biofilm. Se realizó aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de 34 muestras de cárnicos y lácteos. Se evaluó la capacidad de formación de biofilms (débil, moderado o fuerte) de las cepas aisladas y se identificaron los genes *inIA*, *inIB* y *luxS*. Se realizó síntesis química de AgNPs (25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm) y se probaron en cepas control y silvestres de *L. monocytogenes* mediante pruebas de sensibilidad microbiana y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Posteriormente se realizaron ensayos colocando AgNPs a las 0 h. y 24 h. de formación de biofilms. Siete cepas se aislaron de lácteos, y mostraron heterogeneidad en su capacidad para formar biofilm y en la presencia de genes; *Lm4* y *Lm6* formaron biofilm moderado, y *Lm5* y *Lm7* biofilm fuerte, y las cuatro tuvieron los genes *inIA*, *inIB* y *luxS*. Las AgNPs de 250, 500 y 1000 ppm inhibieron el crecimiento bacteriano, mientras que la CMI fue 125 ppm/mL. En cuanto al efecto de las AgNPs a las 0 h. de formación de biofilm, existió diferencia ($P < 0.05$) entre 250 y 1000 ppm, siendo 250 ppm la concentración que evitó la formación de biofilm. A las 24 h. la concentración que eliminó biofilms fuertes fue 1000 ppm. Podemos concluir que las AgNPs tienen un efecto significativo en la formación y eliminación de biofilms de *L. monocytogenes*.

PALABRAS CLAVE: Inhibición bacteriana, alimentos, control de biofilms, matriz extracelular, AgNPs.

2. ABSTRACT

The importance of controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on food contact surfaces has led to the search for agents for their elimination. Silver nanoparticles (AgNPs) could be a strategy because they have antimicrobial properties. The objective was to determine the effect of AgNPs on biofilm formation of *L. monocytogenes* isolated from meat and dairy products, and to identify the presence of the *inIA*, *inIB* and *luxS* genes involved in biofilm formation. Isolation and identification of *L. monocytogenes* was performed from 34 meat and dairy samples. The biofilm formation capacity (weak, moderate or strong) of the isolated strains was evaluated and the *inIA*, *inIB* and *luxS* genes were identified. Chemical synthesis of AgNPs was performed (25, 50, 100, 250, 500 and 1000 ppm) and were tested on control and wild-type strains of *L. monocytogenes* by microbial sensitivity and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests. Subsequently, tests were carried out by placing AgNPs at 0 h. and 24 h. of biofilm formation. Seven strains were isolated from dairy and showed heterogeneity in their ability to form biofilm and in the presence of genes; *Lm4* and *Lm6* formed moderate biofilm, *Lm5* and *Lm7* strong biofilm, and all four had the *inIA*, *inIB* and *luxS* genes. The AgNPs of 250, 500 and 1000 ppm inhibited bacterial growth, while the MIC was 125 ppm/mL. Regarding the effect of the AgNPs at 0 h of biofilm formation, there was a difference ($P < 0.05$) between 250 and 1000 ppm, with 250 ppm being the concentration that prevented biofilm formation. At 24 h. the concentration that removed strong biofilms was 1000 ppm. We can conclude that AgNPs have a significant effect on the formation and elimination of *L. monocytogenes* biofilms.

KEYWORDS: Bacterial inhibition, food, biofilm control, extracellular matrix, AgNPs.

3. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un patógeno que puede transmitirse por el consumo de alimentos contaminados y causar listeriosis. Una de las principales razones por las que *L. monocytogenes* está presente en alimentos, es debido a su capacidad para formar biofilms en superficies de la industria alimentaria, donde puede persistir durante meses o años (dos Santos *et al.*, 2021; Cervantes, 2017). Los biofilms son considerados la principal causa de contaminación de los alimentos, además, corroen los metales y reducen la eficiencia y vida útil de los equipos de la industria alimentaria (Vishwakarma, 2019; Abebe, 2020; Bai *et al.*, 2021).

Esta bacteria ocasiona brotes de listeriosis que pueden afectar la economía de diferentes sectores de la industria alimentaria, sobre todo de productos cárnicos y lácteos por el retiro de productos del mercado (Vidovic *et al.*, 2022). El costo por retirar del mercado los alimentos contaminados, se calcula en 2.4 billones de dólares (Castañeda *et al.*, 2014). *L. monocytogenes* sobrevive en condiciones de conservación de alimentos, multiplicándose en temperaturas de refrigeración, resiste pH extremo y altos niveles de sal (Jaramillo-Bedoya *et al.*, 2021; Vidovic *et al.*, 2022). Además, la formación de biofilms parece estar mediada por genes de detección de quórum y por genes de virulencia (Wang *et al.*, 2022).

Se ha demostrado que la limpieza y desinfección convencional suele ser ineficaz (Cervantes, 2017) por ello es esencial comprender la formación de biofilms y establecer medidas de control efectivas para su eliminación de los entornos de proceso de alimentos (Bai *et al.*, 2021). En este sentido, las nanopartículas de plata (AgNPs) prometen ser una herramienta eficaz, pues son nanomateriales que poseen un amplio espectro de actividad antibacteriana y pueden eliminar microorganismos multirresistentes (Lázic *et al.*, 2020). Esto lo logran a través de diferentes mecanismos como ruptura de la membrana bacteriana y salida de citoplasma, desestabilización de proteínas de membrana, estructurales, citoplasmáticas y de enzimas, así como generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) e hibridación de ADN (Joshi *et al.*, 2020).

En la industria alimentaria, las AgNPs se han utilizado en el envasado de alimentos como productos cárnicos (Mathew *et al.*, 2019). También se han evaluado sobre *L.*

monocytogenes, Chauhan *et al.* (2016) reportaron distorsión celular en células tratadas durante 24 h. y un halo de inhibición de 14 mm. Sin embargo, la información sobre la aplicación de AgNPs en solución sobre la formación y eliminación de biofilms de *L. monocytogenes*, no ha sido descrita por completo. Así mismo, no existe un consenso sobre el papel que desempeñan los genes del quórum sensing y de virulencia en la formación de biofilms, por lo que caracterizar las cepas de *L. monocytogenes* es importante.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Consumo de productos cárnicos y lácteos

El consumo de productos cárnicos y lácteos aumenta debido al crecimiento de la población, el aumento del ingreso per cápita, la globalización y los cambios en los hábitos de consumo que sugieren una preferencia por una dieta rica en proteínas. Esta situación da como resultado una alta demanda de alimentos y conduce a una producción intensiva (Abebe *et al.*, 2020). En este sentido, la producción mundial de carne y de leche ha aumentado en los últimos 50 y 30 años, respectivamente (Ritchie *et al.*, 2017; FAO, 2023)

En México, la carne de res y de cerdo se posicionan en el 2° y 3° lugar como los tipos de carne más consumidos, pues se estima un consumo per cápita de carne de cerdo y res de 20.8 y 15.3 kg, respectivamente. Por otro lado, los productos cárnicos como chorizo, salchicha y jamón son de gran interés por el consumidor gracias a sus atributos organolépticos y practicidad de consumo. El consumo per cápita de estos productos es de 8.3 kg (Jiménez *et al.*, 2020; COMECARNE, 2022).

Los productos lácteos por lo general se consumen frescos, no procesados o ligeramente (pasteurizados o fermentados). En términos de sólidos lácteos, el consumidor prefiere los productos frescos, seguidos de los quesos (OECD-FAO, 2022). El consumo de queso ha ido aumentando y esto se refleja a nivel nacional, pasando de 2.1 kg a 6 kg per cápita en el período de entre 2019 a 2020 (Alonso y Rodríguez, 2023). Otro producto lácteo muy consumido principalmente por niños, adolescentes y adultos jóvenes es el helado (Adamu, 2022). Se estima que en México el consumo per cápita de helado es de 2 litros al año (Trejo, 2017).

3.2. Contaminación bacteriana de productos cárnicos y lácteos

Entre los tipos de contaminación alimentaria, la contaminación bacteriana es la causa más común ocupando el mayor porcentaje (66%) y puede ocurrir en diversos alimentos, donde los mayormente asociados son los productos cárnicos, lácteos y listos para el consumo (LPC). Así mismo, uno de los patógenos mayormente asociados a la contaminación de dichos productos es *L. monocytogenes* (Abebe *et al.*, 2020). La contaminación bacteriana ocurre en cualquier etapa de producción, desde las operaciones con animales vivos hasta la manipulación final en el comercio

minorista. La contaminación directa ocurre del medio ambiente donde se aloja *L. monocytogenes*, sea a partir del suelo, agua, desagües, vegetación, heces animales y humanas, contaminando las instalaciones de las Unidades de Producción Animal. A partir de estas fuentes el patógeno puede ingresar mediante vía oral a los animales, los convierte en portadores y estos excretan las células bacterianas a través de la leche o de las heces, provocando contaminación cruzada de la leche o de la carne. Además, las características de los productos cárnicos y lácteos tales como alto porcentaje de humedad, baja acidez, nutrientes y bajo contenido de sal, brindan excelentes condiciones para el desarrollo de *L. monocytogenes* (Bodie *et al.*, 2023; Titouche *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2023).

Sin embargo, la contaminación también puede ocurrir cuando se manipulan los productos y mediante prácticas sanitarias deficientes. Se ha observado la contaminación a través de las manos de operarios que han estado en contacto con exudados de animales portadores y manipulan los productos finales; esto por una inadecuada limpieza y desinfección de manos. Por otro lado, esta bacteria puede contaminar superficies de contacto con alimentos mal desinfectadas (como máquinas de ordeño, cintas transportadoras, cuchillos y tuberías) y superficies que no están en contacto con alimentos, sobre todo en aquellas donde se forman grietas y son difíciles de limpiar (paredes, desagües, pisos, remolques, contenedores y cajas de transporte), provocando una contaminación de los alimentos. También se ha observado contaminación en el sitio de venta minorista, sobre todo en aquellos donde se aplican procesos como rebanar y envasar, en este caso una de las fuentes frecuentes de contaminación, suelen ser las máquinas cortadoras (Titouche *et al.*, 2022; Thakali y MacRae, 2021; Mazaheri *et al.*, 2022).

Es importante identificar las fuentes de contaminación y de alta prevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos puesto que puede provocar listeriosis en humanos, la cual es una enfermedad transmitida por alimentos (ETAs) (Abebe *et al.*, 2020). En México, la información sobre la prevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos es escasa, debido a que el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), no considera a la listeriosis como una enfermedad de notificación obligatoria (Romero, 2017). Sin embargo, Castañeda *et al.* (2014) reportan el aislamiento de *L.*

monocytogenes en 14% de muestras de salchichas, carne de pollo y carne de res cruda comercializadas en mercados de Sinaloa. Romero (2017) reportan muestras positivas a *L. monocytogenes* del 1.08% en carne del mercado 16 de septiembre y de la Central de Abastos del Estado de México.

Figuroa-López *et al.* (2019) reportan presencia de *L. monocytogenes* del 15.9% (7/44) en muestras de lomo de cerdo de un rastro TIF, 25.7% (9/35) en muestras de lomo de cerdo del rastro no TIF, y 20.8% (5/24) en superficies inertes del rastro TIF.

3.3. *Listeria monocytogenes* causante de enfermedad transmitida por alimentos

L. monocytogenes afecta principalmente a grupos de riesgo, como los ancianos, mujeres embarazadas, recién nacidos e individuos inmunocomprometidos. En esta población puede provocar infección del sistema nervioso central y de la placenta fetal, atravesando barreras (epitelio intestinal, barrera hematoencefálica y placenta), y posteriormente propagarse a otros órganos (Zakrzewski *et al.*, 2023).

La listeriosis es poco frecuente, y por lo general son casos aislados o pequeños brotes con un reducido número de casos. De manera ocasional, pueden aparecer grandes brotes epidémicos (Ripollés, 2018).

La tasa de incidencia según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) es de 4 a 8 casos por cada 1,000,000 personas. En individuos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la listeriosis suele ser entre 100-1000 veces más frecuente que en el resto de la población. En mujeres embarazadas, la infección por *L. monocytogenes* ocurre 13- 20 veces con mayor frecuencia, con una incidencia de listeriosis en el embarazo de 12 por 100,000 mujeres. En un hospital de tercer nivel en México, se ha reportado una incidencia neonatal de listeriosis de 1 por 1,500 nacidos vivos (Rodríguez, 2018).

Según el informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) de 2018 los casos notificados de listeriosis humana invasiva fueron 2549 en la Unión Europea (UE), la carne y productos cárnicos fueron los mayormente asociados (Zhang *et al.*, 2021). De acuerdo con la tabla 1, ha habido ≈18 brotes en el período de entre 1990 a 2020, asociados con el consumo de productos cárnicos provocando muertes, abortos y mortinatos.

Tabla 1. Brotes mundiales por *L. monocytogenes* asociados a cárnicos en el período de 1990-2020.

Año	Lugar	N° de casos	Muerte	Alimento involucrado	Referencia
1992	Francia	279	63 + 22 abortos	Lengua de Cerdo	Zhang <i>et al.</i> (2021)
1998	EUA	101	15 + 6 mortinatos	Salchichas	Cartwright <i>et al.</i> (2013); Zhang <i>et al.</i> (2021)
1999-2006	Europa	8378	ND	Cárnicos, (También frutas/verduras)	Martínez (2020).
2000	EUA	29	4 + 3 abortos espontáneos	Carnes frías	Cartwright <i>et al.</i> (2013); Zhang <i>et al.</i> (2021)
2002	EUA	46	7 + 3 abortos y mortinatos	Productos de pavo Delicatess	Zhang <i>et al.</i> (2021)
2003-2018	Australia	310	ND	Procesados y pollo.	Martínez (2020).
2008	Canadá	57	23	Carnes preparadas "Maple leaf foods".	Romero (2017).
2008-2015	EUA	126	11	Carne y LPC	Zhang <i>et al.</i> (2021)
2012-2016	República Checa	26	3	Productos de pavo	Lakicevic <i>et al.</i> (2023)
2012	Nueva Zelanda	6	2	Cárnicos LPC	Zhang <i>et al.</i> (2021)
2014	Dinamarca	41	17	Carnes frías	Lakicevic <i>et al.</i> (2023)
2017	Sudáfrica	1060	216	Salchichas	Skjerdal <i>et al.</i> (2021).
2017-2019	Países bajos, Bélgica	21	3	LPC	Lakicevic <i>et al.</i> (2023)
2018	EUA	4	1	Jamón	Zhang <i>et al.</i> (2021)
2019	EUA	10	1	Carne en rodajas y quesos	Lakicevic <i>et al.</i> (2023)
2019	EUA	21	3	LPC	Zhang <i>et al.</i> (2021)
2019	España	200	3	Producto de carne asada	Lakicevic <i>et al.</i> (2023)
2020	EUA	12	1	Embutidos	Lakicevic <i>et al.</i> (2023)

Por otro lado, está bien establecido que tanto la leche cruda y pasteurizada, así como sus productos derivados, brindan excelentes condiciones de crecimiento para *L. monocytogenes* y estos productos comúnmente están involucrados en casos y brotes de listeriosis (Ribeiro *et al.*, 2023). De acuerdo con la tabla 2, se estiman ≈36 brotes de listeriosis en el mundo asociados con el consumo de productos lácteos, en el período de 1940 a la actualidad. Los brotes relacionados con los productos lácteos son dos veces más que los reportados por cárnicos.

Tabla 2. Brotes por *L. monocytogenes* vinculados al consumo de leche y productos lácteos en el período de 1940-2023.

Periodo	País	Producto lácteo	N° de casos	Muertes (Mortinatos)
1949-1957	Alemania	Leche cruda	Cerca de 100	NA (NA)
1979	EUA	Leche pasteurizada	23	NA (NA)
1983	EUA	Leche pasteurizada	49	12 (2)
1983-1987	Suiza	Queso blando pasteurizado	122	33 (NA)
1985	EUA	*Queso blando	142	48 (20)
1986	Austria	Leche pasteurizada	28	5 (0)
1989-1990	Dinamarca	*Queso duro	26	6 (NA)
1994	EUA	Leche con chocolate pasteurizada	45	0 (0)
1995	Francia	Queso duro pasteurizado	20	0 (4)
1998-1999	Finlandia	Mantequilla pasteurizada	25	6 (6)
2000	EUA	Queso blando crudo	13	0 (5)
2001	Suecia	*Queso blando	27	0 (0)
2001	Japón	**Queso	86	NA (NA)
2002	Canadá	Queso blando pasteurizado	135	NA (NA)
2005	Suiza	Queso blando pasteurizado	10	3 (2)
2006-2007	Alemania	Queso ácido	189	26 (NA)
2006-2014	Italia	*Queso blando	306	NA (NA)
2007	EUA	Leche pasteurizada	5	3 (1)
2008	Canadá	Queso con leche pasteurizada	38	2 (3)

Tabla 2. Continuación.

2008-2009	EUA	Queso con leche pasteurizada	8	0 (2)
2009	Austria	*Queso de cuajada ácida	14	4 (0)
2009-2010	Austria	*Queso de cuajada ácida	34	8 (NA)
2009-2012	Portugal	Queso blando pasteurizado	30	11 (1)
2011	Bélgica	Queso duro pasteurizado	12	2 (0)
2012	España	Queso blando pasteurizado	2	0 (0)
2012	EUA	*Queso blando	22	4 (1)
2013	EUA	Queso blando crudo	5	1 (1)
2014	EUA	Queso blando	8	1 (NA)
2014	EUA	Leche cruda	2	1 (0)
2014	EUA	Helado pasteurizado	2	0 (0)
2014	EUA	Leche con chocolate sin pasteurizar	2	1 (0)
2014-2015	EUA	*Helado	4	NA (0)
2015-2016	Canadá	Leche con chocolate pasteurizada	34	4 (NA)
2021	EUA	Queso blando pasteurizado	13	1 (2)
2021-2022	EUA	*Helado	28	1 (NA)
2022- En curso	EUA	***Queso en rodajas	16	1 (NA)
2023- En curso	Reino Unido	***Queso semi-blando	3	1 (NA)

*no hay información sobre pasteurización; ** no hay información sobre el nombre del queso; *** brotes en curso bajo investigación; NA: datos no disponibles. Fuente: Ribeiro *et al.* (2023).

4. MARCO TEÓRICO

4.1. *Listeria monocytogenes*

4.1.1. Clasificación taxonómica de *Listeria*

El género *Listeria* pertenece a la familia *Listeriaceae*, clase *Bacilli* y phylum *Firmicutes*, e incluye 15 especies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, y *L. grandensis* (Kocot y Olszewska, 2017). De estas únicamente dos son patógenas, *L. monocytogenes* para humanos y animales, y *L. ivanovii* en animales (Alonso, 2018). *L. monocytogenes* es una especie altamente heterogénea, que comprende cuatro linajes evolutivos (I, II, III y IV) y 13 serotipos diferentes: Linaje I (serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e), Linaje II (serotipos 1/2a, 1/2c, 3a, 3c), Linaje III (serotipos 4a, 4b y 4c),

Linaje IV (serotipos 4a, 4b, 4c). La designación de serotipo está representada por antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (Jánez *et al.*, 2021). El linaje I se encuentra en aislamientos clínicos y alimentarios, aunque mayormente implicado en casos humanos. El linaje II solo se encuentra en aislamientos de alimentos. Los linajes III y IV se asocian principalmente con rumiantes, aunque se aíslan poco (Macleod *et al.*, 2022).

Los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b están relacionados con el 95 % de los brotes y casos esporádicos de listeriosis en humanos, principalmente el serotipo 4b del linaje I (Jánez *et al.*, 2021). Este serotipo también es el principal asociado con casos de neurolisteriosis en rumiantes por lo que ha sido posible aislarlo de heces animales y en entornos agrícolas (Schoder *et al.*, 2023). Por otro lado, se ha sugerido una asociación de cepas aisladas del linaje II, especialmente el serotipo 1/2a, con productos crudos, alimentos LPC y/o sus respectivas instalaciones de procesamiento de alimentos (Valderrama y Cutter, 2013).

Se ha reportado que la resistencia de los aislados de *L. monocytogenes* varía en función del tipo de alimento, fuentes ambientales y países (dos Santos *et al.*, 2021). Los cuatro linajes evolutivos se subdividen en complejos clonales (CC) y tipos de secuencia (ST), o sublinajes (SL) y tipos de MLST del genoma central (CT), respectivamente. Se ha reportado que varios CC pueden ser hipervirulentos en modelos experimentales, incluidos los CC del linaje I que pertenecen al serotipo 4b (como CC1, CC2, CC4 y CC6) (Schoder *et al.*, 2023) y están asociados con casos clínicos, mientras que CC9 y CC121 son aislados hipovirulentos relacionados con alimentos. Esta hipovirulencia se correlaciona con la presencia de un gen defectuoso para la internalina A (*inlA*), una proteína de la pared celular que está presente en muchas cepas del serotipo 1/2a y es crucial para invadir las células epiteliales de los infectados con este patógeno. Se ha reportado que la virulencia de las cepas del serotipo 4b puede estar asociada con *inlA* de longitud completa, isla de patogenicidad LIPI-3 y grupos de genes para la síntesis de ácido teicoico (Jánez *et al.*, 2021). Por lo tanto, la heterogeneidad, virulencia y tolerancia al estrés, varía entre linajes, serotipos y complejos clonales. Esta diferencia y los genes

accesorios específicos del linaje, explican su preponderancia en diferentes nichos ambientales (Macleod *et al.*, 2022), explicados en los siguientes apartados.

4.1.2. Generalidades y morfología de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes es una bacteria omnipresente que habita en una amplia gama de lugares ecológicos, incluidos el suelo, agua, vegetación, desagües, alimentos, las aguas residuales, las heces animales y humanas (Ribeiro *et al.*, 2023).

L. monocytogenes es un microorganismo patógeno, Gram positivo, anaerobio facultativo y móvil gracias a flagelos peritricos; es un bacilo corto de 0.4-0.5 μm de ancho y 1-2 μm de largo, no forma cápsula ni esporas (dos Santos *et al.*, 2021; Vidovic *et al.*, 2022). Su metabolismo es anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa negativa (Galindo, 2021). Posee características fisiológicas únicas que juegan un papel fundamental en su capacidad para ingresar a la cadena alimentaria. Es un patógeno psicrotrófico que tolera temperaturas de entre -18°C a 45°C , por lo tanto, resiste congelaciones repetidas y procedimientos de descongelación; sin embargo, la temperatura óptima es de 30°C a 37°C , y la movilidad por flagelos se da entre 20°C a 25°C (dos Santos *et al.*, 2021; Vidovic *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2023). Banerji *et al.* (2022) menciona que esta bacteria podría tolerar incluso temperaturas de 50°C .

L. monocytogenes crece en presencia de NaCl al 10% (p/v), la actividad de agua (a_w) óptima es de 0.99 pero puede crecer por debajo de 0.90, indicando que es tolerante a la desecación. Por otro lado, crece en ambientes ácidos y alcalinos, en rangos de pH de entre 4.4 a 9.6 (Vidovic *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2023).

Posee un cromosoma circular de entre 2.8–3.2 Mpb (millones de pares de bases) de largo, y algunas cepas presentan plásmidos. Su pangenoma oscila los 6500 genes, de los cuales el 17% están involucrados en el metabolismo de ácidos nucleicos, 14% está implicado en el metabolismo macromolecular celular, y el 10% en el proceso metabólico de las proteínas (Galindo, 2021).

Pese a que le favorecen los ambientes ricos en nutrientes, este patógeno no es exigente nutricionalmente. Y fermenta azúcares como la glucosa, manosa y ramnosa, e hidroliza esculina, inositol y arabinosa (Galindo, 2021).

4.1.2.1. Pared celular

La pared celular de *L. monocytogenes* es una malla compleja de peptidoglicano (PG), ácido teicoico aniónico (TA) y proteínas ancladas a la pared involucradas en la fisiología celular, determinación antigénica, virulencia y protección. La capa gruesa del PG le confiere mayor resistencia y esta característica podría dificultar el ingreso de algunos compuestos como las nanopartículas (NPs) (Sumrall *et al.*, 2020; Cantor y Cadena, 2019). El PG consta de ácido N-acetilmurámico (MurNAc) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). La mayoría de los carbohidratos de la pared es TA polimérico conjugado con el PG (ácido teicoico de la pared o WTA) o unido a la membrana citoplasmática (ácido lipoteicoico o LTA). Los motivos LysM (lisina) y GW (glicina-triptófano) median interacciones no covalentes entre proteínas de superficie y carbohidratos. Proteínas asociadas a WTA incluyen proteínas con dominio GW, como InlA e InlB; mientras que las proteínas asociadas a PGs (P60 y MurA), a menudo contienen un dominio LysM (Figura 1) (Sumrall *et al.*, 2020).

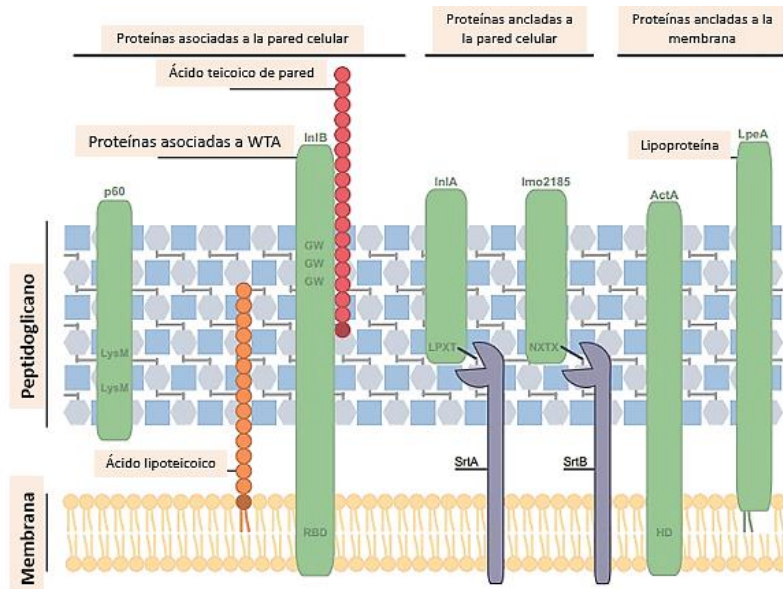


Figura 1. Pared celular de *Listeria*. La capa de PG se representa por encima de la membrana. Fuente: Sumrall *et al.* (2020).

4.1.3. Capacidad para formar biofilms

L. monocytogenes puede formar biofilms sobre superficies (Osek *et al.*, 2022, los cuales son adherencias de células bacterianas planctónicas, incrustadas en una

matriz extracelular (MEC) constituida por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (Mazaheri *et al.*, 2022). La MEC ayuda en la adhesión a superficies duras (carne, frutas, huesos, equipos, mesas, utensilios) (Olanbiwoninu y Popoola, 2023). Las SPE incluyen proteínas, polisacáridos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y teicoicos, lípidos y bacterias muertas, hidratadas en un 85-95% de agua (Colagiorgi *et al.*, 2016; Olanbiwoninu y Popoola, 2023). Le confieren al biofilm una estructura tridimensional y son responsables de la adhesión a superficies, agregación bacteriana, retención de agua, protección frente a los agentes antimicrobianos, absorción de compuestos orgánicos e inorgánicos (reservorio de energía), actividad enzimática (Colagiorgi *et al.*, 2016) y resistencia mecánica (contra líquidos corrientes) (Olanbiwoninu y Popoola, 2023). Por esta razón, las células sésiles que conforman un biofilm son más resistentes que las planctónicas (Hascoët, 2019). La capacidad de formación de biofilm es específica de cada especie y depende de la capacidad de agregación, adhesión y la capacidad de producción de SPE de la bacteria (Yao *et al.*, 2022). Las células formadoras de biofilms de *L. monocytogenes* pueden clasificarse como productoras de biofilm débiles, moderados y fuertes (Janez *et al.*, 2021). Esta clasificación se determina en función de la densidad óptica que posee la biomasa de un biofilm (Fan *et al.*, 2020). En algunos casos, un biofilm puede estar formado por miembros con diferentes capacidades para formar biofilm. Se han informado tres tipos de patrones de formación de biofilm multiespecie: (i) dos o más buenos formadores de biofilm participan juntos, (ii) los formadores de biofilms débiles tienen un lugar en biofilms multiespecies con la ayuda de fuerte adhesión y capacidad de producción de SPE de los buenos productores de biofilm, y (iii) algunos microorganismos o metabolitos microbianos inducen a formadores de biofilms débiles que a los buenos formadores de biofilm (Yao *et al.*, 2022).

4.1.4. Condiciones que influyen en la formación de biofilms

La creación, arquitectura y comportamiento de los biofilms, son influenciados por propiedades de la bacteria (cepa y serotipo, MEC, flagelos, genes), superficie (hidrofobicidad, humectabilidad y rugosidad), industria (matriz alimentaria,

composición del medio, protocolo de limpieza y desinfección, flujos, material de construcción) y ambiente (pH, temperatura, humedad relativa, nutrientes (minerales, agua)) y la presencia de otros microorganismos (Hascöet, 2019; Fysun *et al.*, 2019). La condición de flujo (laminar o turbulento) también afecta significativamente el desarrollo de biofilms en las paredes internas de una manguera (Fysun *et al.*, 2019). En cuanto a temperatura, Colagiorgi *et al.* (2017) demostraron una organización compleja de los biofilms de *L. monocytogenes* a 22 y 37°C en términos de número de células y SPE producidos, mientras que un biofilm rudimentario a 4 y 12°C.

El tipo de superficie tiene gran impacto, pues *L. monocytogenes* forma biofilms con niveles más altos en vidrio, seguido de acero inoxidable y en poliestireno. La presencia de nutrientes en dicha superficie también desempeña un papel importante asociado con la temperatura; se ha demostrado una biomasa mayor a 37°C que a 10°C en una condición densa en nutrientes; sin embargo, sin nutrientes, la biomasa es similar en ambas temperaturas. En este sentido, se destaca la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biofilms en condiciones de estrés por privación de nutrientes, estrés por aumento de sal y por frío (Banerji *et al.*, 2021).

Aunado a las condiciones mencionadas, la viable formación de un biofilm se atribuye a los esfuerzos conjuntos de las capacidades de formación de cada formador que lo constituye (Yao *et al.*, 2022). En este sentido, Colagiorgi *et al.* (2017) ha informado que las cepas del linaje II presentan niveles más altos de producción de biofilm, y que las arquitecturas difieren entre cepas. Forauer *et al.* (2021), mencionan que el linaje I puede formar más biofilm que el linaje II, pero la capacidad de formación varía entre y dentro de linajes, y que aquellas que presentan el SSI-1 (islote de supervivencia al estrés), tienen mejor capacidad para formar biofilm. Esto debido a que el SS-1 brinda resistencia y mejora el crecimiento en condiciones de pH bajo, estrés oxidativo, alto contenido de sal, y suele estar presente en cepas persistentes de la industria alimentaria (Osek *et al.*, 2022).

Ferreira *et al.* (2014) compararon dos estudios donde uno menciona la correlación entre la filogenia y la formación de biofilms, informando que la mayoría de las cepas del linaje I (serotipos 4b y 1/2b) fueron significativamente más capaces de formar biofilms que el linaje II (serotipos 1/2a y 1/2c) y el linaje III (serotipos 4a, 4b y 4c).

También encontraron resultados opuestos con mayor formación de biofilms entre las cepas del linaje II, proporcionando otro ejemplo de la falta de una relación constante entre los subtipos o grupos clonales de *L. monocytogenes* y la capacidad de formar biofilms o adherirse a las superficies.

Janez *et al.* (2021) no encontraron diferencias significativas en la formación de biofilms con respecto al linaje genético, la fuente (ambiental frente a la comida) o el tipo de alimento (pescado frente a la carne), independientemente de la temperatura y la superficie. Esto podría deberse a que las diferencias en la composición total de ácidos grasos o la hidrofobicidad son propiedades específicas de la cepa que se correlacionan con su capacidad de formación de biofilms (Jáneez *et al.*, 2021).

4.1.5. Dinámica de formación de biofilms

La formación de biofilms es un proceso cíclico (Figura 2) que se resume en las siguientes etapas:

1. Adhesión reversible: En esta adhesión la célula bacteriana (planctónica) aún muestra movimiento browniano y puede desprenderse fácilmente de la superficie (Da Silva *et al.*, 2022). Las células se adsorben reversiblemente a una distancia >50 nm a través de fuerzas de Van der Waals, gravitación, interacciones estéricas, electrostáticas e hidrofílicas (Yin *et al.*, 2019; Fysun *et al.*, 2019). Se ha informado que la fijación mejora en superficies rugosas, hidrófobas y cubiertas con sustancias orgánicas. Los apéndices extracelulares como fimbrias, pilis y flagelos fortalecen la interacción; los apéndices y las bacterias se comprometen con el estilo de vida en biofilm o abandonan la superficie y regresan al estado planctónico (Kocot y Olszewska, 2017; Abebe, 2020).

2. Adhesión irreversible: Esta adhesión es mediada por la interacción microbiana con la superficie, comienza la multiplicación celular, seguida de la producción de SPE, estableciendo un biofilm (Da Silva *et al.*, 2022). La unión irreversible involucra fuerzas de corto alcance entre los apéndices celulares y la superficie, interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes hidrofóbicos e iónicos (Fysun *et al.*, 2019). Esta adhesión es inducida a una distancia menor de la superficie (<1.5 nm), y las adhesinas de superficie de las células permiten la

formación de un enlace tipo "cerradura de llave" con la superficie (Yin *et al.*, 2019). Durante este paso, se produce la falta de movilidad de las células adheridas y reciben el nombre de células sésiles (Hascoët, 2019; Abebe, 2020).

3. Formación de microcolonias: Implica la multiplicación de microorganismos y se asocia con una mayor producción de SPE que fortalece la interacción célula-sustrato (Da Silva *et al.*, 2022). Las SPE actuarán como un "pegamento" para fijar microorganismos en diferentes superficies. Las células microbianas experimentan un crecimiento comunitario coordinado que conduce a la formación de microcolonias. Las microcolonias están compartimentadas por canales con microambientes distintos (Yin *et al.*, 2019; Abebe, 2020).

4. Maduración: En esta etapa aumentan las microcolonias, formándose macrocolonias, aumentando la densidad de población (Da Silva *et al.*, 2022). La comunidad se vuelve estable, tridimensional y contiene canales para distribuir eficazmente nutrientes y moléculas de señalización dentro del biofilm (Yin *et al.*, 2019).

5. Dispersión: Una vez que se establece el biofilm maduro, se produce la dispersión de las células sésiles del biofilm como consecuencia de la formación de una capa demasiado densa que trae como resultado la limitación de nutrientes y la acumulación de ácidos y residuos (Kocot y Olszewska, 2017; Da Silva *et al.*, 2022). Para que suceda esta conversión de células sésiles a planctónicas, las células utilizan el mecanismo de detección de quórum sensing (QS) (Olanbiwoninu y Popoola, 2023).

Las células sésiles se dispersan por desprendimiento activo o pasivo a través de comunicación o eliminación de agregados. En el desprendimiento activo, las células abandonan el biofilm y vuelven al estado planctónico, en respuesta a las señales celulares (animándolas a buscar otro sitio de unión). El pasivo ocurre por cambios ambientales, como disponibilidad de nutrientes y el movimiento del líquido circundante, e involucra el desprendimiento o erosión de partes del biofilm por medios químicos o fuerza. La dispersión facilita la contaminación bacteriana, y el biofilm actúa como un depósito que libera células al ambiente para llevar a cabo el

ciclo en otros lugares. Esta recirculación continua les brinda la capacidad de adaptarse a diversos entornos extremos (Coughlan *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2019).

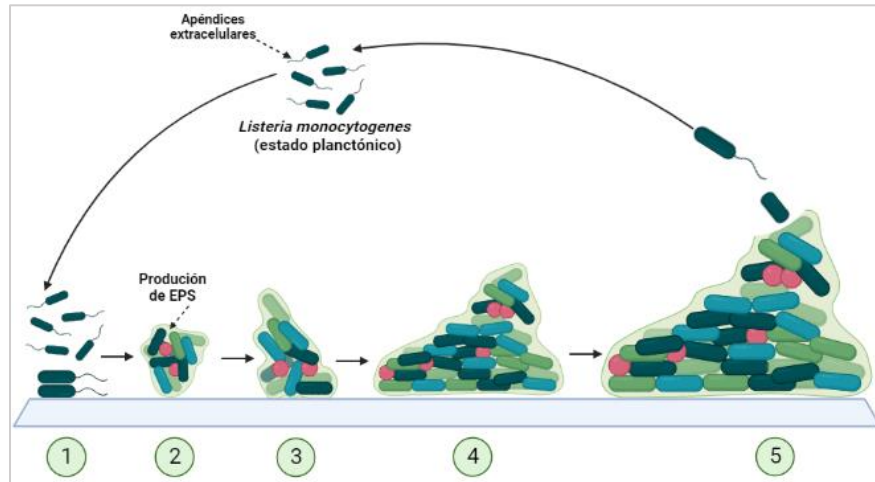


Figura 2. Etapas de la formación de biofilms. Las células planctónicas a través de sus apéndices se acercan a la superficie y se adhieren de forma reversible; las células se multiplican y forman SPE dando como resultado la adhesión irreversible. Se forman microcolonias y llega la etapa de maduración; finalmente las células se dispersan para comenzar un nuevo ciclo. Fuente: Modificado a partir de Yin *et al.* (2019) y Da Silva *et al.*, 2022. Elaborado en Biorender.com

Los biofilms producidos por *L. monocytogenes* pueden ser monocapa, o formar estructuras tridimensionales (Jánez *et al.*, 2021). Los biofilms simples son de 4-6 log UFC/cm², y biofilms multicapa de entre 9-12 log UFC/cm². También pueden tener morfotipos en setas, redondos, en forma de panal (Cervantes, 2017). En el biofilm plano, las células son inmóviles y se encuentran apiladas unas con otras sin dejar espacios; el morfotipo de panal es el más complejo y consiste en capas de células cohesivas, móviles y distribuidas heterogéneamente y tienen huecos con diámetros de 5-50 μm (Figura 3) (Colagiorgi *et al.*, 2017).

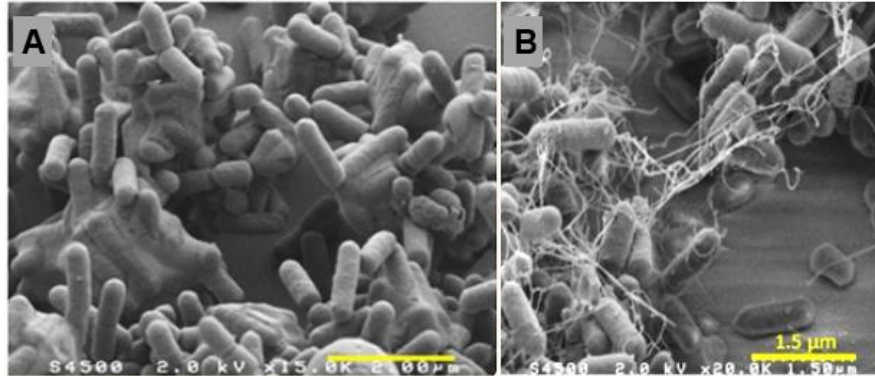


Figura 3. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido de biofilms de *L. monocytogenes*. A: Biofilm plano formado por cepa no móvil 10403S *flaA* (aumento de 1.5×10^4). B: Biofilm en panel formado por cepa H25 (aumento de 2×10^4). Fuente: Guilbau *et al.* (2015).

Reis-Teixeira *et al.* (2017) demostraron que *L. monocytogenes* forma un biofilm de panel a las 96 y 192 h. Este se considera un biofilm maduro porque incluye una población mayor de células sésiles y brinda mejor estabilidad mecánica y absorción de nutrientes para las células de *L. monocytogenes*. Además, posee “bolsas rojas” que rodean a las células viables en tiempos de incubación posteriores y están formadas por células muertas, ADN extracelular y por células móviles ubicadas exclusivamente en los agujeros a una velocidad de $2.3 \mu/s$ (Guilbaud *et al.*, 2015).

4.1.6. Regulación dentro del biofilm: *Quórum sensing*

Las células sésiles del biofilm están muy cerca unas de otras, por ello pueden comunicarse entre sí, e intercambiar material genético. La comunicación microbiana llamada la detección de *quórum sensing* (QS) está relacionada con la densidad de población y se logra mediante la producción y liberación de moléculas señalizadoras químicas (Ripollés-Ávila *et al.*, 2018).

La detección QS es un proceso mediante el cual las bacterias sintetizan, reconocen y responden a moléculas de señalización extracelular conocidas como autoinductores (AI). Las bacterias utilizan la concentración de AI en su entorno para controlar los cambios en el número de células y para coordinar la expresión de

genes específicos del quórum. Estos genes están involucrados en la formación de biofilm, bioluminiscencia, virulencia, esporulación, entre otros (Alav *et al.*, 2018).

En los biofilms, el QS juega un papel importante en la maduración (Ripollés-Ávila *et al.*, 2018) y en la dispersión de las células (Olanbiwoninu y Popoola, 2023).

Las concentraciones de los AI van a ser proporcionales con respecto a las densidades celulares de los biofilms. Es decir, conforme van aumentando las densidades, las concentraciones del AI del medio van incrementándose hasta superar un umbral, que es cuando se producen las interacciones AI-proteína reguladora. *L. monocytogenes* utiliza el sistema QS híbrido, el cual es de tipo luxS, mediado por AI-2; además, las bacterias presentan un sistema de detección sensor histidina quinasa de dos componentes en la superficie celular (Araujo-Cuevas, 2019).

Los AI-2 son moléculas de señalización, producto del ciclo del metilo para el reciclaje de S-adenosilmetionina; en este proceso, el sistema LuxS convierte la S-ribosilhomocisteína en homocisteína que es el precursor de AI-2. La comunicación inicia cuando las moléculas AI-2 de una célula bacteriana son catabolizadas y secretadas al medio extracelular para llevar información a los receptores de otra célula. Las moléculas AI-2 se acumulan en el medio y cuando alcanzan un umbral crítico la interacción con su receptor se vuelve favorable, ya que son reconocidas por una histidin quinasa la cual ayudará como transferasa de grupos fosfatos. La proteína fosforilada es transferida a un regulador de tipo LuXS, y se une a la región promotora del ADN, favoreciendo la transcripción de los genes implicados en la formación de biofilms y en la virulencia. A su vez se lleva a cabo la transferencia horizontal de genes y la liberación de ADN extracelular. A medida que las células aumentan, el sistema LuXS responde a autoinductores que activan la transcripción de genes que codifican la síntesis de polisacáridos. Se dice que la mutación del gen *luxS* en *L. monocytogenes* conduce a una mayor formación de biofilms y mejor adhesión a la superficie (Winkelströter *et al.*, 2016; Soosai, 2017; Warke *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019; Kannan *et al.*, 2020; Banerji *et al.*, 2021).

4.1.7. Genes implicados en la formación de biofilms

La persistencia de *L. monocytogenes* se debe a factores externos, pero también a la presencia de genes específicos que son responsables de la producción de biofilms (Osek *et al.*, 2022). Algunos son genes reguladores, factores de virulencia y varias proteínas de adhesión. El sistema Sigma B (σ B), codifica un gen regulador de la respuesta al estrés, regula múltiples genes de virulencia, y se activa en biofilms proporcionando resistencia contra desinfectantes (Winkelströter *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2021).

La activación de los genes de virulencia en *L. monocytogenes* está regulada por la proteína PrfA, que pertenece a la familia de proteínas receptoras de AMPc de factores de transcripción bacterianos. Regula directamente los genes en la isla de patogenicidad-1 (LIPI-1) de *Listeria*, que incluye a la toxina listeriolisina O (LLO), la proteína ActA, la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PlcA) y la específica de fosfatidilcolina (PlcB), y metaloproteasa (Mpl), todas ellas participan como factores de virulencia. PrfA juega un papel clave en la transición fisiológica del estilo de vida saprófito de *L. monocytogenes* a patógeno. Impacta positivamente en el ambiente extracelular, y los mutantes que carecen de él, tienen defectos en la formación de biofilms posiblemente debido a la respuesta regulatoria deficiente de los factores clave de agregación (Alonso, 2018; Bai *et al.*, 2021; Banerji *et al.*, 2021). Además, varios genes reguladores de flagelos (*flaA*, *mogR*, *flgL*, *motA*, *fliG*, *fliM*, y *fliN*) se han relacionado con la formación de biofilms (Winkelströter *et al.*, 2016).

Por otro lado, las internalinas son proteínas de superficie que consisten en un péptido señal en el extremo N y repeticiones ricas en leucina de 22 aminoácidos (LRR). La región N-terminal por sí sola es capaz de mejorar la penetración bacteriana en células permisivas. Las más relevantes son la internalina A (InIA) y la B (InIB), codificadas por el operón *inIAB*; las proteínas E-cadherina y Met son los receptores de internalinas, respectivamente, ambos ubicados en la superficie de la célula hospedera (Materke y Okoh, 2020).

Existen reportes de una correlación entre expresión del gen *inIA* e *inIB* truncado y la capacidad de *L. monocytogenes* de adherirse a superficies con mayor fuerza (Bonsaglia *et al.*, 2014; Tiong y Muriana, 2016). Esto concuerda con Keeney *et al.*

(2018) y Mahonet *et al.* (2021) quienes demostraron que las cepas con *inIA* truncado y con SSI-1 (islote de supervivencia al estrés) se adhieren mejor que aquellas cepas sin dicho islote y con un *inIA* de longitud completa.

Gilmartin *et al.* (2016) demostraron que los niveles de InIA difieren entre cepas de *L. monocytogenes*, los más altos fueron hallados en las cepas de los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, asociados con la mayoría de los brotes de listeriosis. También compararon la capacidad para formar biofilms entre cepas con una forma truncada de InIA y cepas con InIA de longitud completa. No se observaron diferencias significativas entre el número total de células observadas entre las cepas aisladas de alimentos y una cepa de referencia (InIA de longitud completa). Esto indica que el InIA truncado no tuvo efecto sobre la capacidad de la cepa para formar biofilms en un ambiente rico en nutrientes.

Vázquez *et al.* (2020) mencionan que InIA desempeña un papel importante en los pasos iniciales de la formación de biofilm pero no durante la maduración. Además, se menciona que InIC se ha cuantificado en mayor abundancia en células sésiles de *L. monocytogenes* en comparación con el estado planctónico, lo que sugiere que diferentes internalinas tienen una función específica durante el desarrollo de biofilms. Ripollés-Ávila *et al.* (2018) mencionan que los genes *inIA* y *luxS* están involucrados en la regulación de la formación de biofilms, sobre todo en la unión inicial a la superficie.

4.2. Ingreso y persistencia de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria

L. monocytogenes puede ingresar a la industria alimentaria a través de diferentes vías. Puede hacerlo mediante el ingreso de leche cruda o de carne contaminada, a través de vehículos, animales domésticos o silvestres. Otra vía muy común es mediante los operarios que están en contacto con exudados de animales portadores de la bacteria y provocar una contaminación cruzada. Esto si no realizan una correcta higienización de manos, vestimenta y botas (Rodríguez *et al.*, 2021; Da Silva *et al.*, 2022; Titouche *et al.*, 2022). Una vez que *L. monocytogenes* ingresa forma biofilms sobre superficies, facilitando la posterior recontaminación de alimentos (Ripollés, 2018). Esto debido a la dispersión de células y recirculación

dentro de las mismas instalaciones, que permite tanto la contaminación como la formación de un nuevo biofilm (Coughlan *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2019).

En la industria láctea suelen formarse en las tuberías de transportan de leche, paredes, en tanques de almacenamiento, silos de leche, en unidades de llenado, entre otros (Fysun *et al.*, 2019). En cuanto a la industria cárnica, pisos y lavabos se han identificado como focos potenciales y un punto de partida para la transferencia de *L. monocytogenes* a otras superficies y utensilios, como cuchillos, tablas de cortar, cortadoras y trituradoras, esto debido a la dificultad para limpiar y desinfectar (Mazaheri *et al.*, 2021). Este patógeno ha persistido en la industria durante meses o incluso 7 años (Cervantes, 2017) (Tabla 3).

Tabla 3. Aislamientos de cepas persistentes de *L. monocytogenes* en la industria.

Industria alimentaria	Lugares de aislamiento				Sitio problema	Período persistencia	Serotipos persistentes
	Materia prima	Equipos	Ambiente	Producto final			
Salmón	-	+	+	+	Ahumador	8 meses	1/2a
Helados	-	+	+	+	Envasadora	7 años	1/2b
Quesos	-	-	+	+	Empacadora	7 años	3b
Carne	-	-	+	+	Máquina cortadora	5 años	1/2c
	-	+	-	+	de cubos	2 años	1/2a, 3a
	+	+	+	+	Sierras	1 año	1/2a, 1/2c
Procesamiento aves de corral	+	+	+	+	Sierras	2 años	1/2a, 1/2c
Procesamiento aves de corral	-	+	+	+	Desagües	17 meses	1/2a, 1/2c

El símbolo + indica que en ese lugar se realizó aislamiento, el símbolo – indica que no se realizó aislamiento. Fuente: Moretro y Langsrud (2004).

4.3. Métodos de control de biofilms de *L. monocytogenes*

Es de suma importancia prevenir la formación de biofilms y en aquellos casos donde exista presencia, contar con metodologías para poder eliminarlos de las superficies de contacto con alimentos. De acuerdo con Chamorro *et al.* (2014), debe existir la gestión de la inocuidad alimentaria a través de la aplicación de Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) y de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) previa y durante la implementación. Así mismo, la industria debe contar con un Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

(HACCP), para establecer procesos de control que garanticen la inocuidad del producto. Por otro lado, Etter *et al.* (2017) mencionan que para eliminar cepas persistentes de *L. monocytogenes* se requiere, además, una limpieza profunda que involucre otras metodologías. Esto puede atribuirse a que las SPE dificultan la difusión de moléculas inhibitoras, y con ello, las células de la capa externa están expuestas a muy bajas concentraciones mientras que las células internas encuentran concentraciones subletales, lo que conduce a la selección de fenotipos resistentes a los antimicrobianos (Ripollés, 2018; Abebe, 2020; Banerji *et al.*, 2021). El problema con las cepas persistentes aumenta en los entornos de producción artesanal con prácticas rudimentarias, donde los productores tienen contacto directo con la materia prima y producto final (Jaramillo-Bedoya *et al.*, 2021). Actualmente, las NPs basadas en metales están ganando mucho interés y se proponen como nuevos agentes antimicrobianos prometedores de próxima generación debido a su capacidad para inhibir y erradicar la formación de biofilms, así como células planctónicas (Muthulakshmi *et al.*, 2022).

4.4. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son nanomateriales que poseen un amplio espectro de actividad antibacteriana, bactericida, estabilidad, propiedades oligodinámicas, toxicidad relativamente baja, y pueden eliminar microorganismos multirresistentes (Lázic *et al.*, 2020; Naganthran *et al.*, 2022). Su tamaño es de entre 1 y 100 nm y se consideran únicas debido a su pequeño tamaño, gran área de superficie-volumen, alta capacidad portadora, alta reactividad y fácil variación de las propiedades de la superficie. Se han utilizado ampliamente en aplicaciones agrícolas, comerciales, médicas e industriales, como aditivo en adyuvantes de vacunas, cicatrización de heridas, biosensores (Naganthran *et al.*, 2022), y está aprobada por la FDA antimicrobiano en medicamento tópico (Muthulakshmi *et al.*, 2022). Las AgNPs cobran aún más relevancia puesto que también se han utilizado en la industria alimentaria, como en el envasado de productos cárnicos (Mathew *et al.*, 2019). Además, se ha reportado que a diferencia del riesgo de resistencia a los

antimicrobianos comunes que puede ser una gran limitante, las AgNPs no inducen resistencia bacteriana (Al-Shabib *et al.*, 2020).

En cuanto a límites permisibles, la EFSA ha establecido un límite de migración de plata, de 0.05 mg/L y 0.05 mg/kg en el agua y los alimentos, respectivamente (Istiqola *et al.*, 2020). En México, existe la NOM-127-SSA1-2017, donde se indica un límite permisible de 0.05 mg/L de plata total en agua, más no se menciona si estos límites sean aplicables en alimentos y/o superficies.

4.4.1. Síntesis de AgNPs

Se utilizan diferentes métodos para sintetizar NPs metálicas. Los enfoques *top-down* (descendentes) implican reducir el tamaño de Ag^+ metálica a nanoescala, e incluyen a los métodos físicos. Los *bottom up* (ascendentes) consisten en la nanoestructuración y estabilización de átomos de Ag^+ para formar NPs e incluyen síntesis química y biológica (Salleh *et al.*, 2020; Bruna *et al.*, 2021).

Sin embargo, el método más comúnmente utilizado para sintetizar AgNPs como dispersiones coloidales estables en agua o solventes orgánicos, es la reducción química debido a su simplicidad y versatilidad, siendo accesible y rentable (Naganthran *et al.*, 2022; Marinescu *et al.*, 2022).

Este método utiliza agua o disolventes orgánicos para reducir las sales metálicas de Ag^+ e involucra un agente reductor, precursor metálico y agente estabilizante (Salleh *et al.*, 2020). Los agentes reductores más utilizados son citrato de sodio, borohidruro de sodio, polietilenglicol (PVP) y reactivo de Tollen. Estos agentes se utilizan para la reducción del estado de oxidación de Ag^+ a Ag^0 en soluciones acuosas y no acuosas. La introducción de estos agentes reductores conduce a una velocidad de reacción rápida, para producir núcleos metálicos (nucleación) que producen partículas extremadamente pequeñas (crecimiento) (Naganthran *et al.*, 2022). El tamaño y forma de las AgNPs dependerá de varios factores de la reacción como la agitación magnética, temperatura y pH, (Escobar, 2015; Marinescu *et al.*, 2022); además, una velocidad de reacción lenta conducirá a la aglomeración de partículas (Naganthran *et al.*, 2022).

Uno de los protocolos más utilizados es el de Turkevich y Khan, que consideran AgNO_3 como precursor y citrato de sodio como reductor (Crisan *et al.*, 2021). Por

otro lado, existe el método Lee-Meisel y el método Creighton, que consisten en la reducción de AgNO_3 con borohidruro de sodio, y da lugar a AgNPs de 10 nm con una distribución estrecha de tamaño (monodispersas) (Escobar, 2015).

4.4.2. Caracterización de AgNPs

Las propiedades únicas de las AgNPs determinarán su potencial. Existen diversas técnicas para caracterizar las AgNPs en función de sus propiedades estructurales, ópticas o eléctricas. La caracterización estructural se subdivide en morfología, estructura cristalina y composición. Además, existen técnicas de espectroscopía y microscopía que se usan frecuentemente: UV-Visible, Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), Dispersión de luz dinámica, (DLS), Análisis de rayos X de energía dispersiva (EDX) y Fotoluminiscencia (PL) (Naganthran *et al.*, 2022). El microscopio electrónico de barrido (SEM), el microscopio electrónico de transmisión (TEM), el microscopio de fuerza atómica (AFM) y el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM) son ejemplos de técnicas microscópicas muy utilizadas (Naganthran *et al.*, 2022).

Es importante conocer el tamaño de las AgNPs, pues de acuerdo con Crisan *et al.* (2021), las más pequeñas (<10 nm) están asociadas con una penetración más fácil en la pared bacteriana y una destrucción más intensa por la acumulación de ROS. Se ha descrito que AgNPs de tamaño pequeño y mediano afectan gravemente el transporte de electrones mitocondriales, fagocitosis, autofagia, integridad y la organización de los orgánulos (Crisan *et al.*, 2021).

La forma también juega un papel importante y se han analizado tres formas: esférica, cilíndrica y triangular truncada y su eficacia frente a *E. coli* en solución y placas de agar. Concluyendo que AgNPs triangulares ocuparon el primer lugar seguidas de las esferas y, finalmente, de las cilíndricas. También se ha investigado en *S. aureus*, llegando a la conclusión de que las nanoplaquetas tienen la mayor toxicidad, seguidas de las nanoesferas, las nanovarillas y los nanocubos (Crisan *et al.*, 2021). Xu *et al.* (2020) por su parte, reportan que las AgNPs con forma esférica muestran mejores efectos que las triangulares, lineales y cúbicas.

4.4.3. Mecanismo de acción de las AgNPs en biofilms

Las AgNPs se adhieren a la pared celular o membrana de las bacterias por atracción electrostática entre la carga positiva de iones de plata (Ag^+) que se genera a partir de la oxidación de las AgNPs y la membrana cargada negativamente (grupos carboxilo, fosfato y amino). Los efectos se ven influidos por el tamaño de la NP, y se reconoce que las <10 nm podrían modificar la penetrabilidad celular (Ahmad *et al.*, 2020). En general, las AgNPs erradican los biofilms bacterianos a través de siete modos distintos de acción:

(1). Interactúan con la bicapa lipídica, así como con LPS de las bacterias, y rompen la membrana bacteriana a través de la fluidización e hidrofobicidad de la membrana. Tras la interrupción, las NPs y sus iones lixiviados acceden al citosol por poros de la membrana, provocando el filtrado del contenido citoplasmático (Joshi *et al.*, 2020).

(2). Desestabilizan las proteínas de membrana (p. ej., bombas de expulsión), **(3) las proteínas estructurales citoplasmáticas** (p. ej., actina), y **(4) varias enzimas** (p. ej., la familia de las oxidorreductasas). Esto conduce a daños morfológicos irreversibles, y también colapso estructural, mala adhesión a la superficie, inhibición de las vías metabólicas y muerte de las células (Joshi *et al.*, 2020).

(5) Los iones lixiviados de AgNPs generan especies reactivas de oxígeno (ROS), y radicales superóxidos, radicales hidroxilos y el peróxido de hidrógeno (Joshi *et al.*, 2020). La producción de ROS y radicales libres causa estrés oxidativo en bacterias y este es el principal mecanismo que se asocia con la antimicrobiana de las AgNPs. ROS pueden inducir daño a los lípidos, filtración de biomoléculas y la apoptosis. El mecanismo de la vía de señalización depende de la cascada de fosforilación y desfosforilación de proteínas o enzimas esenciales para la actividad celular y el crecimiento bacteriano. Las AgNPs median la apoptosis al interrumpir la red citoesquelética de actina bacteriana MreB, provoca cambios morfológicos y aumenta la fluidez de membrana (Salleh *et al.*, 2020; Bruna *et al.*, 2021).

(6) Los iones interactúan con grupos amino, carboxilo y mercapto libres de proteínas y ácidos nucleicos (Joshi *et al.*, 2020). El ADN se compone principalmente de fósforo y cuando interactúa con los iones Ag^+ , estos causan la

inestabilidad de su estructura. La replicación se ve afectada, puesto que, al interactuar los iones Ag^+ con el ADN, provocan la hibridación del ADN de doble hebra, lo que implica la disociación de las hebras al interrumpir los puentes de hidrógeno. Con ello, impide la síntesis de proteínas al desnaturalizar los componentes ribosómicos citoplasmáticos. La transducción de señales microbianas se afecta por la fosforilación de los sustratos de proteínas, y las AgNPs podrían potencialmente desfosforilar los residuos de tirosina sobre los sustratos de péptidos. La interrupción de la transducción podría causar la apoptosis celular e inhibición de la propagación celular (Ahmad *et al.*, 2020; Salleh *et al.*, 2020).

(7) Inhiben la cadena de transporte de electrones de las células bacterianas, lo que conduce a un intercambio de iones deteriorado a través de la membrana, desestabilización de la membrana y actividad metabólica reducida (Joshi *et al.*, 2020). En conjunto, estos efectos conducen a la muerte de las células bacterianas y a la eliminación del biofilm (Figura 4) (Joshi *et al.*, 2020).

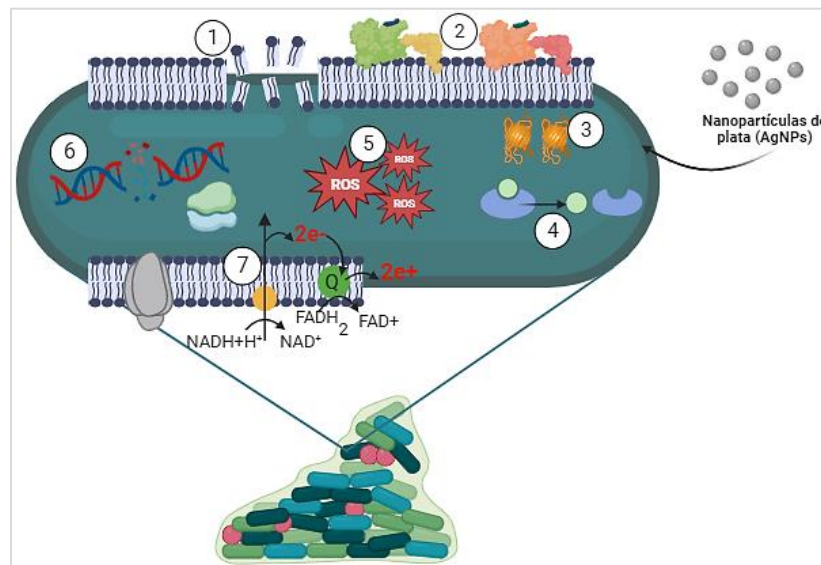


Figura 4. Mecanismos de acción descritos para AgNPs sobre células sésiles. Estos incluyen la ruptura de la membrana y salida del citoplasma (1), desestabilización de proteínas (2,3,4), generación de ROS (5), hibridación del ADN afectando la replicación (6), y la inhibición de la cadena de transporte de electrones (7). Fuente: Modificado a partir de Joshi *et al.* (2020). Elaborado en biorender.com

4.4.4. AgNPs contra *L. monocytogenes*

Se ha comprobado que *L. monocytogenes* es sensible a los iones de AgNPs (Belluco *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2021). Chauhan *et al.* (2016) mencionan que células tratadas con AgNPs durante 48 h, mostraron distorsión celular y una zona de inhibición de 14 mm. Estas células presentaron contracción y deformación en comparación con las del grupo control (sin AgNPs). También se encontraron restos celulares dispersos, confirmando la presencia de plata (0.72 %) en las células tratadas, estableciendo el papel de AgNPs en los daños celulares.

Markowska *et al.* (2018) demostraron un daño del 50% en la estructura de células de *L. monocytogenes* a nivel de la pared celular, con lo que se provocó permeabilidad, lisis celular y autólisis de PGs. Se demostró que las AgNPs aumentaron la salida de ADN en un 48% y de proteínas en un 30 % después de 60 min. La salida máxima de ADN y proteínas ascendió al 171% y al 191%. La mejora observada del eflujo de ADN y proteínas como resultado del tratamiento con AgNPs apunta al daño de la pared celular.

5. JUSTIFICACIÓN

La formación de biofilms de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, es un problema creciente debido a la presencia de cepas que poseen genes que les confieren mayor resistencia y parecen mejorar su capacidad para formar biofilms; por ello la limpieza y desinfección convencional se vuelven ineficaces. La búsqueda de estrategias para prevenir la formación de biofilms o para eliminarlos, es indispensable para garantizar la inocuidad de productos cárnicos y lácteos. De este modo, ha surgido gran interés por la aplicación de AgNPs y son las investigaciones previas las que demuestran que podrían tener un efecto importante en el control de biofilms bacterianos.

6. HIPÓTESIS

Una concentración adecuada de AgNPs inhibirá la formación de biofilms de *L. monocytogenes*.

7. OBJETIVOS

7.1. General

Determinar el efecto de las AgNPs sobre la formación de biofilms de *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos y lácteos, e identificar la presencia de los genes *inlA*, *inlB* y *luxS* involucrados en la formación de biofilm.

7.2. Específicos

- Aislar e identificar cepas de *L. monocytogenes* en productos cárnicos y lácteos.
- Realizar la síntesis de AgNPs.
- Evaluar el efecto de AgNPs sobre la capacidad de formación de biofilms de *L. monocytogenes*.
- Determinar la presencia de los genes *inlA*, *inlB* y *luxS* en las cepas de *L. monocytogenes* aisladas.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Veterinario de Ciencia de la Carne y Salud Pública (LVCCySP) del Departamento de Producción Agrícola y Animal, y en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular (LMyBM) del Departamento de Atención a la Salud, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

8.1. Obtención de muestras de productos cárnicos y lácteos

El muestreo y transporte de muestras se realizó siguiendo lo establecido por la NOM-109-SSA1-1994. Por muestreo aleatorio se obtuvo un total de 34 muestras de 200 g cada una: 8 muestras de cárnicos (carne de res (1) y cerdo (1) almacenadas en congelación por tiempo prolongado, jamón (2), salchicha (2) y chorizo (2) de una tienda de conveniencia de la Ciudad de México. Y 26 muestras de lácteos (leche cruda de vaca (2) de la CDMX; quesos: panela (6), ranchero (6), Oaxaca (10), y helado tradicional (2) de una quesería artesanal y heladería del Estado de México. La toma de muestra de productos envasados con presentación comercial para venta al menudeo se llevó a cabo de forma no aséptica y tomándose del mismo lote. Una vez obtenidas las muestras, se colocaron en bolsas herméticas estériles,

previamente identificadas. Las muestras se transportaron y conservaron a 4°C con ayuda de un termo refrigerante, hasta su evaluación en el laboratorio.

8.2. Aislamiento e identificación de cepas de *L. monocytogenes*

8.2.1. Aislamiento de colonias presuntivas a *Listeria*

El procedimiento para aislar e identificar *L. monocytogenes* constó de cuatro etapas según la NOM-143-SSA1-1995 (Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*): enriquecimiento, aislamiento en medio selectivo, resiembra de aislamientos presuntivos y pruebas de confirmación (macroscópicas, microscópicas y bioquímicas).

Enriquecimiento. Cada muestra se homogeneizó y se tomó una parte representativa de 25 g y posteriormente se colocaron en un matraz con capacidad de 500 ml, que contenía 225 ml de Medio de Enriquecimiento para *Listeria* (LEB) (BD Difco™). Se homogeneizó en un ULTRA-TURRAX® T25 (IKA) a 2,800 rpm durante 2 min de acuerdo con Ramires *et al.* (2020) y se colocó en una incubadora eléctrica FE-131 (FELISA) por 48 h a 30°C. Este experimento se realizó por duplicado.

Aislamiento en medio selectivo. A partir del cultivo de enriquecimiento se tomó una asada y por estría cruzada, se sembró en Medio Oxford (BD Difco™), incubando a 35°C por 24 h. Después de las 24 h, las colonias que presentaron de 2-3 mm de diámetro, color negro con un centro hundido negro y rodeado de zonas oscurecidas, se consideraron presuntivas según lo descrito por Alonso (2018) y la NOM-143-SSA1-1995.

Resiembra de aislamientos presuntivos. A partir del cultivo del medio selectivo, se seleccionaron tres colonias presuntivas y cada una de ellas se sembró por estría cruzada, en una caja de Agar Soya Trypticaseína con 0.6% de Extracto de Levadura (ASTEL) (BD Bioxon). Las placas se incubaron a 35°C por 24 h. Los cultivos obtenidos se mantuvieron a 4°C y se utilizaron como inóculo en las pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas.

8.2.2. Identificación macroscópica, microscópica y bioquímica

Las colonias aisladas en el medio ASTEL, se sometieron a identificación mediante diferentes pruebas:

Observación macroscópica. Se describieron las características macroscópicas de las colonias aisladas: forma, tamaño, superficie, elevación, borde, estructura interna, color, opacidad y consistencia (Bustos *et al.*, 2007).

Observación microscópica. Se realizó mediante tinción diferencial de acuerdo con Bustos *et al.* (2007) como se describe a continuación.

-Tinción de Gram: A partir de cultivos de 24 h se tomó una colonia con un asa bacteriológica y se extendió sobre un portaobjetos. El portaobjetos se cubrió con cristal violeta durante 1 min para después dejar escurrir y lavar con agua. Luego se cubrió con Lugol durante 1 min, se dejó escurrir y enjuagó con agua. Por goteo lento se añadió alcohol-acetona por 30 s y se procedió a lavar inmediatamente con agua. Después se cubrió con safranina durante 1 min y se enjuagó de inmediato con agua. Finalmente se dejó secar al aire perfectamente hasta que no quedaran gotas de agua en el frotis. Se observó la preparación con el objetivo 10x (seco débil) y después con el 40x (seco fuerte). Sobre el frotis se colocó una gota de aceite de inmersión para poder observar con el objetivo 100x (inmersión).

Pruebas bioquímicas. Para determinar las características metabólicas de las colonias aisladas, se realizaron las pruebas bioquímicas de acuerdo con la NOM-143-SSA1-1995 y con Idland *et al.* (2022). Se realizó prueba de catalasa, Kligler, movilidad en fresco, movilidad en agar Sulfuro Indol Movilidad (SIM), actividad hemolítica y fermentación de ramnosa.

-Catalasa: Se colocó una gota de solución de peróxido (3%) sobre un portaobjetos y posteriormente una colonia de un cultivo puro con ayuda de un palillo de madera estéril y se mezcló hasta emulsificarlo. La lectura se realizó de 10 a 20 s después.

-Kligler: Un cultivo puro se inoculó en tubos con medio Kligler en pico de flauta, esto por punción profunda y por estría en el pico. Los tubos inoculados se incubaron a 37°C por 24 h, se observó el cambio de coloración y desprendimiento del medio para ver formación de gas o ácido sulfhídrico (H₂S).

-Prueba de movilidad en fresco: Se realizó colocando una gota de solución salina (0.85%) sobre un portaobjetos, posteriormente con un palillo de madera se añadió una de las colonias presuntivas y se mezcló hasta emulsificarse. Se cubrió con un cubreobjetos y se observó con objetivo de inmersión en un microscopio de campo oscuro.

-Movilidad en agar SIM: A partir de un cultivo puro, se tomó una colonia y se sembró por punción profunda en un tubo con medio semisólido SIM (Sulfuro Indol para movilidad). Se dejó incubando por 7 días a temperatura ambiente (20-25°C) y se observó diariamente para identificar crecimiento a lo largo de la picadura, turbidez y/o cambio en la coloración del medio.

-Actividad hemolítica: Se dibujó una cuadrícula de 25 espacios en el fondo de una placa con agar sangre (5%). Por el método de picadura, se inoculó un cuadro por cada cultivo puro y se incubó por 48 h a 35°C. También se realizó siembra por estría cruzada por cada uno de los cultivos puros en agar sangre, incubando a 37°C durante 24 h.

-Prueba de utilización de carbohidratos (ramnosa): Un cultivo puro se inoculó por punción en tubos de caldo púrpura de bromocresol adicionados con 0.5 % de ramnosa. Se incubó durante 7 días a 35°C y se observó el cambio en la coloración diariamente.

Informe de la prueba. Los resultados positivos y negativos se definieron de acuerdo con la tabla 4 y se informan como presencia / ausencia en 25 g o 25 ml de muestra, respectivamente.

Tabla 4. Indicaciones de resultados positivos a *L. monocytogenes*.

Prueba	Resultado positivo	Resultado negativo
Tinción de Gram	Bacilos cortos Gram positivos dispuestos de forma individual o en cadena de color azul-púrpura.	Células Gram negativos de color rosa-rojo.
Catalasa	Formación inmediata de burbujas	No formación de burbujas, o formación escasa después de 20 a 30 s.

Tabla 4. Continuación.

Kligler	Gas -: Sin desprendimiento del medio. H ₂ S -: sin cambio en la coloración.	Gas +: Con desprendimiento del medio. H ₂ S +: color negro.
Hemólisis	β-hemolítica: Zona clara o blanca alrededor del punto de picadura.	α-hemolítica: Zona verde Gama hemolítica: Sin modificación en la zona.
Movilidad en agar	Móvil en forma de paraguas. Turbidez a lo largo y fuera de la picadura.	Sin movilidad
Utilización de carbohidratos Ramnosa	Ramnosa +: color amarillo	Ramnosa -: color púrpura

Fuente: Elaborado a partir de datos de la NOM-143-SSA1-1995.

8.2.3. Identificación molecular de cepas de *L. monocytogenes* por amplificación del gen 16S rRNA

Extracción de ADN de cepas bacterianas. Las colonias de un cultivo de 24 h de *L. monocytogenes* se sembraron en caldo BHI y se incubaron a 37°C durante 24 h. A partir de este cultivo se tomó 1.5 mL y se colocaron en microtubos Eppendorf™ para extraer ADN utilizando el kit Wizard Genomic DNA (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cultivo se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante (SND). Las células se suspendieron en 480 µL de Ácido Etilendiaminotetraacético EDTA (50 mM); posteriormente se añadió 60 µL de enzima lítica (lisozima) (10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 40 min. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó durante 2 min a 13,000 rpm y se eliminó el SND. Para la lisis celular, se añadió 600 µL de solución de lisis de núcleos y se pipeteó suavemente para mezclar; se incubará durante 5 min a 80°C y pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 3 µL de solución de ARNasa (4 mg/mL) y se mezcló invirtiendo el tubo de 2 a 5 veces, para después incubar a 37°C durante 60 min; pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 200 µL de solución de precipitación de proteínas y los microtubos se agitaron con el vórtex. Se incubó durante 5 min en hielo y luego de este tiempo se centrifugó a 13,000 rpm por 3 min. Para la precipitación y

rehidratación de ADN, se transfirió el SND a un microtubo estéril y se añadió 600 µL de isopropanol y se mezcló por pipeteo y por inmersión hasta que el ADN formara una masa visible. Se centrifugó con las mismas condiciones y se decantó el SND; posteriormente se añadió 600 µL de etanol (70%), se mezclará invirtiendo el tubo para lavar el botón del ADN. Posteriormente se centrifugó nuevamente y se eliminó el SND que contenía etanol. Luego de ello se dejó secar el sedimento al aire sobre papel absorbente durante 15 min. Finalmente se rehidrató el sedimento de ADN en 100 µL de solución de rehidratación durante la noche a 4°C. Transcurridas las 24 h se verificó la integridad del ADN en un gel de agarosa (1%) en TBE (0.5 X) (Tris, 50 Mm, ácido bórico 50 mM y EDTA 0.2 Mm, pH 8). El gel se cargó con 5 µl del ADN extraído más 1 µL de buffer carga Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega). El gel se colocó en una bandeja de electroforesis y se corrió a 80 V durante 45 min; transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/mL) a una concentración final de 0.5 mg/mL y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. El ADN extraído se guardó a -20°C.

Amplificación del gen 16S rRNA por PCR punto final. Para realizar la identificación molecular de las cepas aisladas, se amplificó el gen universal 16S rRNA, mediante PCR punto final en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, de BIO-RAD) y los oligonucleótidos de estudio fueron 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 1492R (5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3') de acuerdo con Wang y Jiang (2022) y el 1401R (5'-CGT GTG TAC AAG ACCC-3') de acuerdo con Sharma *et al.* (2022).

Se utilizó 7.5 µL de Máster Mix 2X (Promega), 1.0 µL de cada cebador (forward y reverse) a 1.0 µM, 1.0 µL de templado de DNA, 3.5 µL de agua libre nucleasas y 1.0 µL de albúmina sérica bovina, en un volumen final de 15 µL de reacción. Como control negativo se utilizó 1.0 µL agua libre de nucleasas y como control positivo, 1.0 µL de templado de DNA de una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC.

Las condiciones de PCR punto final fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 s,

alineamiento a 50°C por 40 s y extensión a 72°C por 40 s. La extensión final a 72°C durante 7 min antes de mantener a 4°C.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Borato-EDTA) (pH 8.4), en una cámara de electroforesis (BIO-RAD PowerPac™) a 80 V durante 40 min. Los geles se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador UV GelVue (Syngene GVM20).

Purificación de productos de PCR. Los productos de PCR se purificaron enzimáticamente mediante el procedimiento ExoSAP-IT™ (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) añadiendo al producto de PCR, 1.0 µL de fosfatasa alcalina y 1.0 µL de exonucleasa. Posteriormente se incubó a 37°C durante 15 min para degradar componentes restantes, seguido de la inactivación a 80°C durante 15 min de acuerdo con Thomassen *et al.* (2022). Una vez purificados los productos, se almacenaron de inmediato a -70°C en un ultracongelador REVCO™.

Los productos purificados fueron enviados a secuenciar a MacroGen© y una vez secuenciados, las secuencias se alinearon utilizando el programa informático Nucleotide BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para ver las similitudes de las secuencias de acuerdo con Mahoney *et al.* (2022).

Crioconservación de cepas: Se realizó utilizando glicerol de acuerdo con Abouloifa *et al.* (2022) con algunas modificaciones. Una colonia de un cultivo de 24 h se inoculó en tubos con caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BD Bioxon), incubando a 37°C durante 24. Transcurrido este tiempo, 1.5 mL del contenido del tubo se transfirió a tubos Eppendorf™ y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 2 minutos. El SND se descartó y al pellet se agregó 1000 µl de una mezcla de caldo BHI con 10% de glicerol, mezclando hasta homogeneizar. Posteriormente, las cepas conservadas se almacenaron en un ultracongelador vertical Revco™ (Thermo Scientific) a -70°C.

8.3. Síntesis de AgNPs

Se realizó síntesis química de AgNPs por reducción de sales metálicas de Ag⁺ según el método de Lee-Meisel (Sileikaite *et al.*, 2009); empleando AgNO₃ como precursor metálico y citrato de sodio como agente reductor de acuerdo con Escobar (2015) con algunas modificaciones.

Se prepararon soluciones de AgNPs de 250 mL a concentraciones de 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 ppm. Para ello se colocaron 0.0031 g, 0.0062 g, 0.0125 g, 0.0625 g, 0.125 g, 0.25 g, y 0.50 g, respectivamente, en vasos de precipitado con 125 mL de agua desionizada, y se puso a calentar en una parrilla de agitación hasta ebullición. Posteriormente se añadió gota a gota 2 mL de citrato de sodio (1%) por cada 100 mL de solución. La mezcla se mantuvo a 70°C con agitación constante durante 2 h. y luego se retiró del calor (Sileikaite *et al.*, 2009). La formación de AgNPs se confirmó por el cambio en la coloración (Escobar, 2015). Se dejó reposar a temperatura ambiente y se aforó a 250 mL con agua desionizada. Finalmente, las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente en frascos de vidrio ámbar para no ser expuestos a la luz.

8.3.1. Caracterización de AgNPs

Espectroscopía UV-Vis. La caracterización primaria de AgNPs se realizó de acuerdo con Alsakhawy *et al.* (2022) y Siddique *et al.* (2020) con algunas modificaciones. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis (Beck Coulter DU® 730 UV/Vis Spectrophotometer) en un intervalo de longitud de onda de 300–700 nm. Las soluciones de AgNPs (250 y 1000 ppm) se prepararon realizando diluciones 1:10 con agua desionizada (Siddique *et al.*, 2020).

Tamaño de partícula. El tamaño promedio de las AgNPs se analizó mediante difracción de rayos X de acuerdo con Muthulakshmi *et al.* (2022), en un analizador de partícula Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950 (Horiba®).

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Se realizó para detectar los diferentes patrones de unión y grupos funcionales/ especies químicas enlazadas a la superficie de las AgNPs y las reacciones producidas por el agente reductor, de acuerdo con Escobar (2015) y Summer *et al.* (2023). Para ello se utilizó

un Espectrómetro FTIR (PerkinElmer's Spectrum Two™ FT-IR spectrometer) en picos de absorción de entre 650 y 4000 cm⁻¹.

8.4. Determinación del efecto antimicrobiano de las AgNPs

Prueba de sensibilidad antimicrobiana. Esta prueba se realizó para determinar el efecto de cada concentración de AgNPs, utilizando la cepa *Lm* ATCC 7644 y las cepas de *L. monocytogenes* aisladas en este estudio; mientras que *Escherichia coli* (ATCC 10586) y *Staphylococcus aureus* (29213) se utilizaron como controles.

Se realizó la prueba de difusión en pozos de agar de acuerdo con Chaudhari *et al.* (2022) con algunas modificaciones. De cada cepa se tomó una colonia de 24 h. y se sembró en 3 mL de caldo Müeller Hinton (MH) y se incubó a 37°C durante 24 h.; transcurrido el tiempo, la suspensión bacteriana se ajustó a 0.5 McFarland (1.5x10⁸ UFC/mL) (Akbarizadeh *et al.*, 2022). En condiciones asépticas se perforaron seis pozos equidistantes en placas de agar MH, utilizando un horador estéril (7 mm) de acuerdo con Chaudhari *et al.* (2022) y Fentie *et al.* (2022). Cada suspensión bacteriana se sembró por duplicado en la superficie del agar con un hisopo estéril mediante siembra masiva (Alsakhawy *et al.*, 2022; Akbarizadeh *et al.*, 2022). Posteriormente, en cada pozo se vertió 35 µL de cada solución de AgNPs a evaluar (25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm), llenando por duplicado para cada concentración. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h y transcurrido el tiempo, se midieron los halos de inhibición y se expresaron en milímetros (mm).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se realizó siguiendo la técnica de macro dilución en caldo de acuerdo con la guía CLSI (2012) (Clinical Laboratory Standards Institute, 2012), realizando mediciones por triplicado. Se probaron las soluciones de AgNPs de 2000 ppm utilizando las cepas *Lm* ATCC 7644, *Lm5* y *Lm7* (aisladas de lácteos); y las AgNPs de 250 ppm utilizando *Lm7*. Cada cepa se sembró por triplicado en tubos con 3 mL de caldo MH y se incubaron a 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron diluciones 1:2 a partir de las soluciones de AgNPs y se agregaron las cantidades de caldo y de AgNPs correspondientes, de acuerdo con la tabla 5.

Posteriormente, las suspensiones con cultivo bacteriano se ajustaron a 0.5 McFarland en tubos con 10 mL de caldo MH y se añadió la cantidad de cultivo de acuerdo con la tabla 5. En el momento en que se añadió el cultivo bacteriano (T0) se midió la turbidez del tubo final en un densitómetro (Densimat bioMérieux ®) y se procedió a incubar a 37°C por 24 h con agitación constante. Transcurridas las 24 h se realizó la medición de turbidez (T24) en el densitómetro.

Tabla 5. Diluciones realizadas en el Ensayo de Macro dilución.

Solución de AgNPs evaluada	Tubo	Componentes		
		Cantidad de AgNPs	Cantidad de caldo	Cantidad de cultivo bacteriano
	Control negativo	-	2 mL	-
Solución madre: AgNPs de 2000 ppm	Control positivo	-	1 mL	1 mL
	Dilución 1	1 mL	-	1 mL
	Dilución 2	0.8 mL	0.2	1 mL
	Dilución 3	0.6 mL	0.4 mL	1 mL
	Dilución 4	0.4 mL	0.6 mL	1 mL
	Dilución 5	0.2 mL	0.8 mL	1 mL
	Dilución 6	0.1 mL	0.9 mL	1 mL
	Control negativo	-	2 mL	-
	Control positivo	-	1 mL	1 mL
Solución madre: AgNPs de 250 ppm	Dilución 1	1 mL	-	1 mL
	Dilución 2	0.5 mL	0.5 mL	1 mL
	Dilución 3	0.25 mL	0.75 mL	1 mL
	Dilución 4	0.125 mL	0.875 mL	1 mL
	Dilución 5	0.0625 mL	0.9375 mL	1 mL

El valor de CMI se determinó como la concentración más baja de AgNPs que evitó el crecimiento de bacterias visibles (sin turbidez) en comparación con un control negativo después de la incubación (Fentie *et al.*, 2022; Alsakhawy *et al.*, 2022).

8.5. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms de *L. monocytogenes*

Las cepas aisladas de *L. monocytogenes* fueron sometidas a la evaluación de su capacidad de formación de biofilms, a través del método de cuantificación en placa a través del Ensayo de cristal violeta según Fan *et al.* (2020) con algunas modificaciones, y realizando mediciones por cuadruplicado.

Como control positivo se utilizó una cepa de *S. aureus* ATCC 29213, mientras que como control negativo se utilizó *S. epidermidis* ATCC 12228. Una colonia de cada cepa control fue sembrada en caldo soya tripticaseína (TSB) suplementado con 0.5% de dextrosa y 3% de NaCl y se incubó a 37°C durante 24 h. Del mismo modo, una colonia de *Lm* ATCC 7644 y de tres cepas aisladas de lomo de cerdo (*Lm* 1.1, *Lm* 1.2 y *Lm* 10.1), así como las aisladas en este estudio, se sembraron en caldo infusión cerebro corazón (BHI) y se incubó bajo las mismas condiciones.

Transcurrido el tiempo de incubación, 100 µL de cultivo se colocaron en 200 µL de medio TSB en microplacas de poliestireno transparente de 96 pocillos (Corning™) para los controles positivos y negativos. En el caso de *L. monocytogenes*, 100 µL de cultivo se colocaron en 200 µL de caldo BHI. De forma independiente, 200 µL de caldo BHI se colocaron en cuatro pocillos que servirían como blanco. La placa se incubó a 37°C sin agitación durante 24 h. Posteriormente, las bacterias planctónicas se removieron y los pozos se lavaron tres veces con Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) (pH 7.4). Las células se fijaron con 200 µL de etanol (100%) e inmediatamente este se retiró y se dejó secar por 10 min en la campana sin tapa. Se agregaron 125 µL de Cristal Violeta (0.1% w/v) y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Transcurrido este tiempo se retiró el cristal violeta y se lavó tres veces con 200 µL de PBS. Posteriormente se volteó la placa sobre papel adsorbente eliminando todo el líquido. Finalmente, se agregó 200 µL de etanol (95%) y se agitó por 10 min en plataforma de agitación. Para clasificar a los biofilms se midió la lectura de su densidad óptica (DO) en un Microplate Reader modelo 680 (BIO-RAD) a 595nm (Nowak *et al.*, 2021). La formación de biofilms se determinó en función de la diferencia entre las mediciones del promedio de las DO del blanco y los promedio de las DO de las demás cepas; en cuanto a la fuerza del biofilm se interpretó bajo la clasificación descrita en la tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de tipos de biofilms.

Densidad óptica (DO)	Tipo de biofilm
<0.120	Ausente
0.121 a 0.480	Débil
0.481 a 0.720	Moderado
> 0.721	Fuerte

Fuente: Lee *et al.* (2017) y Fan *et al.* (2020).

8.6. Evaluación del efecto de AgNPs en los biofilms de *L. monocytogenes*

Diseño experimental. Para evaluar el efecto de AgNPs en los biofilms de *L. monocytogenes*, se realizaron dos ensayos. En el ensayo 1 las AgNPs se colocaron a las 0 h. de la formación de biofilm. En el ensayo 2 las AgNPs se agregaron a las 24 h. de formación de biofilm. Para ambos ensayos se probaron los tratamientos de estudio descritos en la tabla 7.

Tabla 7. Descripción de tratamientos.

Tratamiento	Concentraciones de AgNPs
TC	Control: sin AgNPs
T250	250 ppm de AgNPs
T500	500 ppm de AgNPs
T1000	1000 ppm de AgNPs

TC: Tratamiento control, T250: Tratamiento 250 ppm, T500: Tratamiento 500 ppm, T1000: Tratamiento 1000 ppm.

Para ambos ensayos se evaluaron tres cepas de *L. monocytogenes*: *Lm.* ATCC 7644, *Lm5* y *Lm7* (aisladas en este estudio). Se utilizaron 36 pozos de una Microplaca por ensayo, distribuidos para cada uno de los tratamientos, realizando mediciones por triplicado (Figura 5).

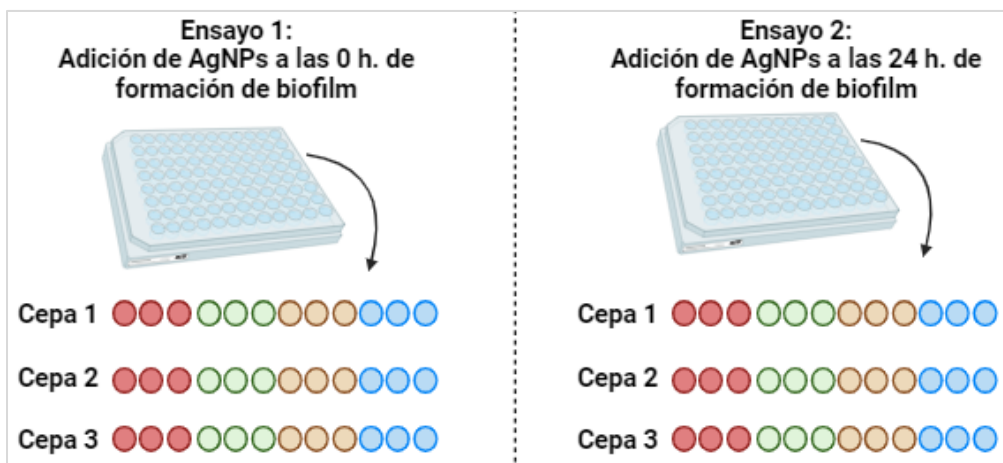


Figura 5. Esquematización del diseño experimental. Los círculos corresponden a los pozos de la microplaca que se llenaron por tratamiento para cada cepa evaluada. El círculo rojo corresponde al TC, círculo verde al T250, círculo naranja a T500 y círculo azul a T1000.

8.6.1. Cuantificación de biofilms

Siembra de cultivos bacterianos. Se utilizaron cepas control de *S. epidermidis* 12228 (negativo), *S. aureus* 29213 y *S. epidermidis* 35983 (positivos). Una colonia de las cepas control se sembró en tubos con caldo soya tripticaseína (TSB) suplementado (0.5% dextrosa y 3% NaCl) y se incubó a 37°C por 24 h. Una colonia de las cepas de *L. monocytogenes* se sembró en tubos con caldo infusión cerebro corazón (BHI) y se incubó a 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las cepas se ajustaron a 0.5 McFarland de acuerdo con Siddique *et al.* (2020).

Ensayo 1. Se inocularon los pocillos de una microplaca de 96 pocillos de poliestireno y fondo plano (Corning™), con 10 µL del cultivo de las cepas control (*Staphylococcus*) y 190 µL de caldo TSB. Adicionalmente se inocularon 200 µL de caldo que serviría como blanco. Este ensayo se realizó de acuerdo con Siddique *et al.* (2020) y Marinescu *et al.* (2022) con algunas modificaciones. Los componentes se añadieron juntos en el T0 (Figura 6): se inocularon pocillos con 190 µL de caldo BHI, 10 µL del cultivo de *L. monocytogenes*, y 100 µL de las soluciones de AgNPs. Posteriormente se incubó a 37°C durante 24 h, sin agitación.

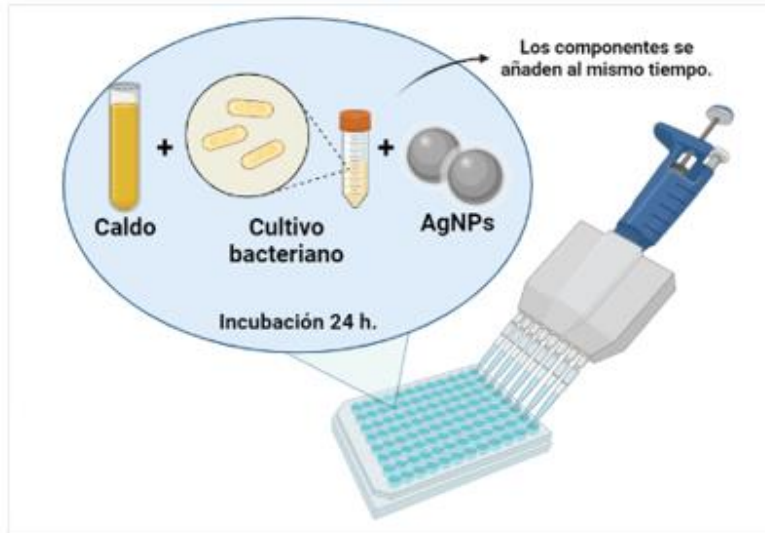


Figura 6. Esquema del ensayo 1. Los componentes se añadieron a las 0 h. de formación de biofilm y posteriormente se incubaron durante 24 h.

Ensayo 2. De igual forma se inocularon los pocillos de una microplaca con 10 μL del cultivo de las cepas control (*Staphylococcus*) y 190 μL de caldo TSB. Adicionalmente se inocularon 200 μL de caldo que serviría como blanco.

Siguiendo con el Ensayo 2 para las cepas de *L. monocytogenes*, este se realizó en dos etapas (Figura 7), de acuerdo con Bourguignon *et al.* (2022) con algunas modificaciones. Se inocularon pocillos con 190 μL de caldo BHI y 10 μL del cultivo de las cepas de *L. monocytogenes*. Después se incubó a 37°C sin agitación durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación la placa se lavó tres veces con Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) (Siddique *et al.*, 2020). Luego se añadió 100 μL de las diferentes soluciones de AgNPs (0, 250, 500 y 1000 ppm) de forma independiente y se incubó nuevamente a 37°C durante 24 h. Adicionalmente, tres pocillos se inocularon con 300 μL de solución de AgNPs que serviría como blanco para el caso de las cepas tratadas.

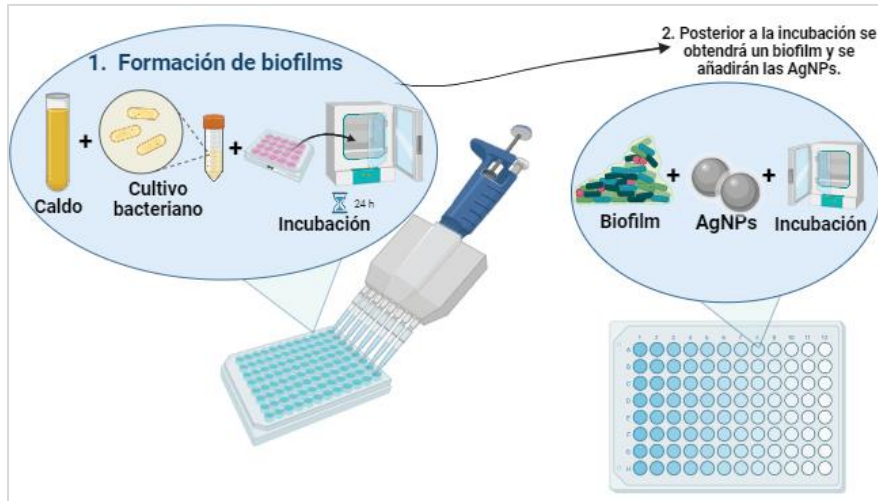


Figura 7. Esquema del ensayo 2. Este ensayo constó de dos etapas: se añadieron los dos componentes necesarios para formar un biofilm y se incubó; después se añadieron las soluciones de AgNPs a las 24 h. de formación de biofilm.

Ensayo cristal violeta y lectura. A partir de este punto ambos ensayos siguieron las mismas indicaciones. El contenido de los pocillos de las dos placas se retiró suavemente y se lavó tres veces con PBS para eliminar las células planctónicas. Posteriormente se realizó el ensayo cristal violeta anteriormente descrito, de acuerdo con Fan *et al.* (2020), así como la lectura de la DO y la clasificación de los biofilms antes descritos. Adicionalmente se calculó el porcentaje (%) de la formación de biofilms con la adición de AgNPs de acuerdo con Siddique *et al.* (2020), siguiendo la siguiente fórmula:

$$PFB = 100\% - \left(1 - \frac{DO_{Ct}}{DO_c} \times 100\right)$$

Donde: **PFB**= Porcentaje de formación de biofilm, **DO_{Ct}**= Densidad óptica de células tratadas con AgNPs, **DO_c**= Densidad óptica del control no tratado.

8.7. Identificación de genes de formación de biofilm en *L. monocytogenes*

8.7.1. Amplificación de los genes *inlA*, *inlB* y *luxS*

La identificación de los genes *inlA*, *inlB* y *luxS* específicos de *L. monocytogenes*, se realizó por PCR punto final en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, de BIO-RAD). Se utilizaron oligonucleótidos específicos descritos en la tabla 8. La amplificación de estos genes se realizó a partir las cepas de *L. monocytogenes* aisladas, así como la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Lm* 1.1, 1.2 y 10.1.

Tabla 8. Oligonucleótidos específicos para los genes de estudio.

Gen	Oligonucleótidos forward (f) y reverse (r)	Tamaño de amplicón. Pares de bases (pb)	Ref.
<i>inlA</i>	(f) 5'TGTTACAAGAACCTACGGCACCAACAA 3' (r) 5'TTGGCGCTATATTGGGCATATAAGGTGATG 3'	145 pb	Tiong y Muriana (2016).
<i>inlB</i>	(f) 5'AACCTTTCCTTAGACCGATACG 3' (r) 5'TTGGTAGACCGATAGCTTATTCAC 3'	150 pb	Tiong y Muriana (2016).
<i>luxS</i>	(f) 5'GGA AAT GCC AGC GCT ACA CTC TTT 3' (r) 5'ATT GCA TGC AGG AACTTC TGT CGC 3'	208 pb	Warke <i>et al.</i> (2017).

Se utilizó 10.0 µL de Máster Mix 2X (Promega), 1.0 µL de cada oligonucleótido (forward y reverse) a 1.0 µM, 1.5 µL de templado de DNA, 5.5 µL de agua libre nucleasas y 1.0 µL de albúmina sérica bovina, en un volumen final de 20 µL de reacción.

Las condiciones de PCR punto final para los genes *inlA* e *inlB* fueron las siguientes de acuerdo con Tiong y Muriana (2016): desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización de 1 min a 95°C, alineamiento de 40 s a 55°C para el gen *inlA* y 50°C para el gen *inlB*, extensión de 60 s a 72°C y un ciclo de extensión final de 72°C durante 10 min antes de mantener a 4°C.

Las condiciones para el gen *luxS* fueron las siguientes de acuerdo con Warke *et al.* (2017): desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 30 s cada uno a 94°C, alineamiento de 30 s a 55°C y extensión de 1 min a 72°C. Y finalmente a 72°C durante 7 min.

Los productos de PCR se tiñeron con bromuro de etidio y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) en amortiguador TBE 0.5 X (Tris-Borato-EDTA) (pH 8.4), en una cámara de electroforesis (BIO-RAD PowerPac™) a 80 V durante 40 min, utilizando un marcador DNA Ladder 100 pb (Promega). Los geles se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador UV GelVue (Syngene GVM20). Los productos de PCR del gen *inIA* e *inIB* se purificaron enzimáticamente mediante el procedimiento ExoSAP-IT™ (Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) descrito anteriormente de acuerdo con Thomassen *et al.* (2022). Mientras que los productos de del gen *luxS* se purificaron mediante la técnica de purificación a partir de un fragmento del gel de acuerdo con Mpundu *et al.* (2022), con el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello el fragmento del gel de agarosa visualizado en el transiluminador fue cortado con una cuchilla y se transfirió a un tubo de microcentrifuga Eppendorf el cual había sido pesado previamente. Posteriormente se añadió solución de unión a membrana en una proporción de 10 µL de solución por 10 mg de fragmento de gel de agarosa. Se puso en vórtex y se incubó a 65°C durante 10 minutos hasta disolver el fragmento y se centrifugó. Para la purificación por centrifugación se colocó una minicolumna SV en un tubo y la mezcla del gel disuelto se transfirió a este tubo con minicolumna, incubando a 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 min. Luego se quitó la minicolumna SV del conjunto de columna de centrifugación, y se desechó el líquido. La minicolumna se devolvió al tubo y se lavó la columna añadiendo 700 µL de solución de lavado de membrana y se centrifugó durante 1 minuto a 14.000 rpm. Se vació el tubo y se repitió el lavado con 500 µL de solución de lavado de membrana y se centrifugó por 5 min. Posteriormente se vació el tubo y nuevamente se centrifugó el conjunto de columna durante 1 min para evaporar algún etanol residual. Luego se transfirió la minicolumna SV a un tubo de microcentrifuga limpio de 1,5 ml y se añadió 50 µL de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna sin tocar la membrana. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto, se centrifugó por 1 minuto a 14.000 rpm; finalmente se desechó la

minicolumna SV y se almacenó el tubo de microcentrífuga que contiene el producto eluido a -20°C.

Una vez purificados los productos, se almacenaron de inmediato a -70°C en un ultracongelador REVCO™.

Los productos purificados fueron enviados a secuenciar a MacroGen© y una vez secuenciados, las secuencias se alinearon utilizando el programa informático Nucleotide BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para ver las similitudes de las secuencias de acuerdo con Mahoney *et al.* (2022).

8.8. Análisis estadístico

Los resultados de la formación de biofilm con aplicación de AgNPs, se analizaron considerando un modelo completamente al azar con la concentración de AgNPs como efecto fijo. El modelo es el siguiente: $Y_{ijk} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$, Donde: Y_{ijk} = Variable respuesta y representa al % de formación de biofilm, μ = Media general, T_i = Efecto de las concentraciones de AgNPs, y ϵ_{ij} = Representa al error experimental. Estos resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias de las medias con respecto al control y entre tratamientos, con la prueba Tukey (significancia de 0.05). Los datos se procesaron utilizando el software estadístico GraphPad Prism (Versión 8.0.1.). Los demás resultados obtenidos se analizaron utilizando estadística descriptiva.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de productos cárnicos y lácteos

Identificación macroscópica. Se obtuvieron cinco aislamientos presuntivos (5/8) a *Listeria spp.*, pertenecientes a una muestra de chorizo y las muestras de carne de res y cerdo; a partir de los productos lácteos se obtuvieron 19 aislamientos presuntivos (19/26) en función del patrón de crecimiento en el medio selectivo. Las colonias presuntivas mostraron una forma circular, diámetro de 1-2 mm, color negro y café, rodeadas por un halo negro y centro hundido (Figura 8) de acuerdo con la NOM-143-SSA1-1995 y con Shourav *et al.* (2020).

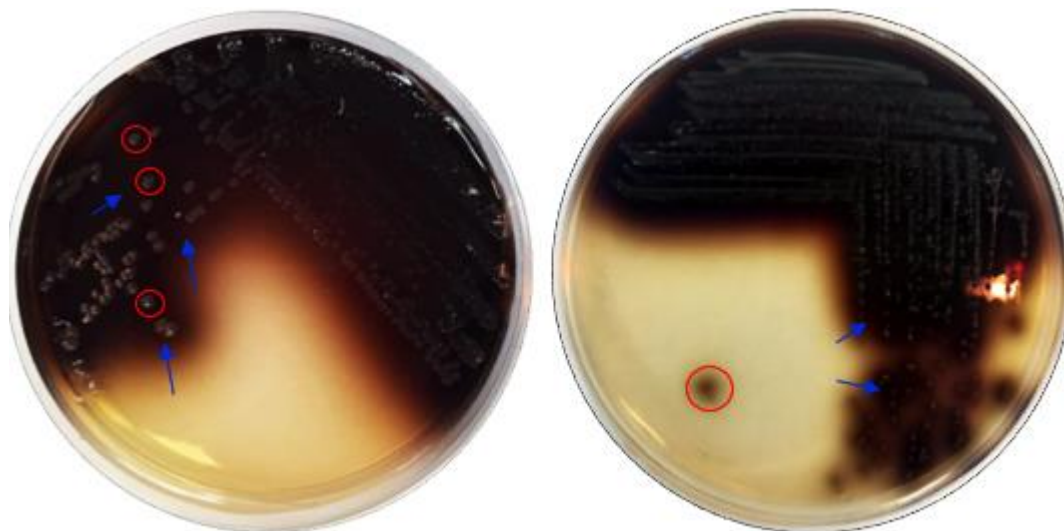


Figura 8. Aislamientos presuntivos de *L. monocytogenes* en medio selectivo Oxford, obtenidos de productos lácteos. En los círculos rojos se aprecian las colonias y las flechas azules indican el halo negro que rodea a las colonias, esto debido a la hidrólisis de esculina, característico de *Listeria spp.*

Identificación microscópica de *L. monocytogenes*. De los 24 aislamientos presuntivos de cárnicos y lácteos, solo 11 aislamientos (11/24) cumplieron con las características morfológicas de *L. monocytogenes* en la tinción diferencial de Gram, mostrándose como bacilos cortos Gram positivos (Figura 9).

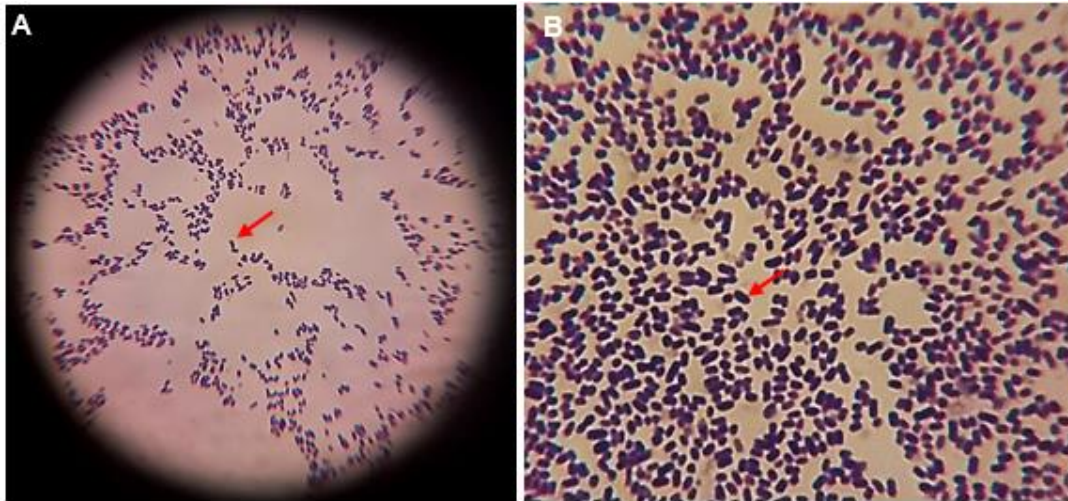


Figura 9. Fotografía microscópica (objetivo de 100 X) de un aislamiento presuntivo con tinción Gram. A: Campo completo de una muestra de helado, donde se aprecian bacilos cortos Gram positivos señalados con flecha roja. B: Ampliación del campo.

Identificación bioquímica. La movilidad en fresco mostró bacilos cortos con movilidad giratoria, mientras que la movilidad en agar SIM se observó durante 7 días, donde desde el día 1 se visualizó movilidad mostrando un crecimiento típico en paraguas (Figura 10) de acuerdo con la NOM-143-SSA1-1995. En cuanto a la prueba de hemólisis, a las 24 h se obtuvieron colonias traslúcidas y grises con una estrecha zona de β -hemólisis que se apreció mejor a las 72 h a 37°C (Figura 10).

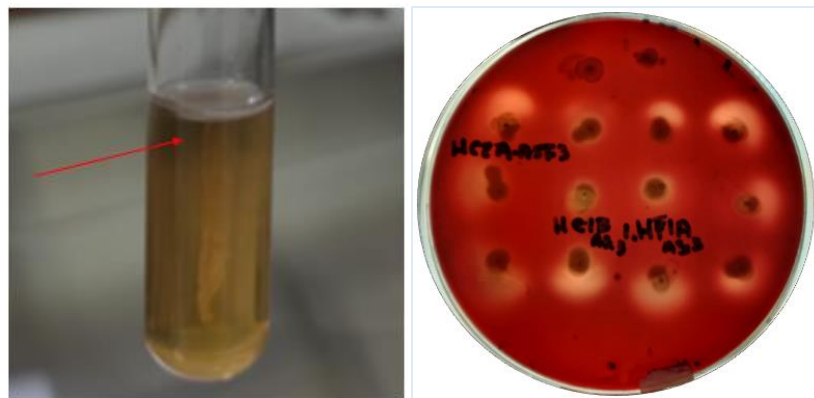


Figura 10. Fotografías de pruebas bioquímicas. Del lado izquierdo se aprecia la movilidad en agar SIM con un crecimiento en forma de paraguas. Del lado derecho se aprecia la β -hemólisis por el método de picadura en cuadrícula.

Las pruebas bioquímicas indicaron que solo 7 cepas (7/11) pertenecientes a lácteos cumplieron con las características de *L. monocytogenes*: Catalasa positiva, movilidad en fresco positiva (giratoria), movilidad en agar positiva, formación de gas y H₂S negativas, Ramnosa positiva y actividad β-hemolítica. Descartando de este modo, a las cepas de cárnicos como positivas a *L. monocytogenes* (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de las pruebas de identificación bioquímica de *L. monocytogenes* en cárnicos y lácteos.

Cepa	Muestra	Catalasa	Movilidad en fresco	Movilidad en agar	Kligler		Ramnosa	Actividad hemolítica
					Gas	H ₂ S		
1	Helado	+	+	+	-	-	+	β-hemólisis
2	Helado	+	+	+	-	-	+	
3	Helado	+	+	+	-	-	+	β-hemólisis
4	Helado	+	+	+	-	-	+	β-hemólisis
5	Queso ranchero	+	+	+	-	-	+	β-hemólisis
6	Queso ranchero	+	+	+	-	-	+	β-hemólisis
7	Queso ranchero	+	+	+	-	-	+	β-hemólisis
8	Chorizo	+	+	-	-	-	-	β-hemólisis
9	Chorizo	+	+	-	-	-	-	β-hemólisis
10	Chorizo	+	+	-	-	-	-	β-hemólisis
11	Carne de res	+	+	-	-	-	-	α-hemólisis

H₂S: Formación de Ácido Sulhídrico.

Se obtuvo una presencia de *L. monocytogenes* del 11.76% en las muestras analizadas. Las muestras positivas fueron una muestra de queso ranchero proveniente de Poxtla, Edo. de México, y dos muestras de helado tradicional Texcoco, Edo. de México (Tabla 10).

Tabla 10. Origen y presencia global de *L. monocytogenes* en productos lácteos y cárnicos.

N° de muestra	Producto	Origen	Total de muestras	Ausencia/ Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en 25 g de muestra.
1	Queso panela	Texcoco, Edo.Méx.	1	Ausente
2	Queso ranchero	Texcoco, Edo.Méx.	1	Ausente
3	Queso Oaxaca			Ausente
4	Queso Oaxaca			Ausente
5	Queso Oaxaca	Texcoco, Edo.Méx.	5	Ausente
6	Queso Oaxaca			Ausente
7	Queso Oaxaca			Ausente
8	Leche	Ciudad de México	1	Ausente
9	Leche	Ciudad de México	1	Ausente
10	Helado	Texcoco, Edo.Méx.	1	Presente
11	Helado	Texcoco, Edo.Méx.	1	Presente
12	Queso Oaxaca			Ausente
13	Queso Oaxaca			Ausente
14	Queso Oaxaca	Texcoco, Edo.Méx.	5	Ausente
15	Queso Oaxaca			Ausente
16	Queso Oaxaca			Ausente
17	Queso ranchero			Ausente
18	Queso ranchero			Presente
19	Queso ranchero	Poxtla Edo.Méx.	5	Ausente
20	Queso ranchero			Ausente
21	Queso ranchero			Ausente
22	Queso panela			Ausente
23	Queso panela			Ausente
24	Queso panela	Poxtla Edo.Méx.	5	Ausente
25	Queso panela			Ausente
26	Queso panela			Ausente
27	Jamón de pierna		2	Ausente
28	Salchicha	Tienda express de CDMX	2	Ausente
29	Chorizo		2	Ausente
30	Carne de res		1	Ausente
31	Carne de cerdo	Almacenada en congelación	1	Ausente
Total			34	

No se aisló *L. monocytogenes* en productos cárnicos, esto puede deberse a que dichos productos reciben tratamiento térmico que podría eliminar bacterias; sin embargo, de acuerdo con Da Silva *et al.* (2020) la contaminación con este patógeno puede ocurrir incluso después de recibir tratamiento térmico y su presencia suele ser común en la carne cruda. El hecho de que no estuviera presente en las muestras de cárnicos analizadas no descarta la presencia de otros microorganismos, incluso podría tratarse de otra especie del género *Listeria spp.* Akrami-Mohajeri *et al.* (2018) mencionan que también puede aislarse *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. murayii*.

Las muestras positivas fueron queso ranchero y helado tradicional. De acuerdo con Jaramillo-Bedoya *et al.* (2021), la presencia de este patógeno en quesos podría deberse a una contaminación ocurrida después de la pasteurización de la leche o durante la elaboración del queso. Puesto que las instalaciones de elaboración del queso artesanal podrían no cumplir con las condiciones sanitarias adecuadas, las superficies podrían no estar desinfectadas y los queseros artesanales pueden tener contacto directo con la materia prima y el producto final.

Borena *et al.* (2022) reportan que, de 54 muestras de helados analizadas, obtuvieron 12.96% positivas a *L. monocytogenes*, observándose un rango similar a nuestros hallazgos. La presencia de *L. monocytogenes* en helado puede deberse a que sea capaz de sobrevivir a la pasteurización en leche o durante la mezcla de los componentes; el producto también podría contaminarse en otras etapas del procesamiento, como en la maduración, congelación, llenado, moldeo y envasado (Neha *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2022). Otra razón por la que puede estar presente es que los estabilizantes del helado son un factor asociado con el aumento de la tolerancia térmica de *L. monocytogenes*, posiblemente por la captura del microorganismo en la red tridimensional formada con micelas de caseína (Neha *et al.*, 2018). Salazar *et al.* (2020) comprobó que *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir y de no disminuir su población bacteriana en bolas de helado, a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 36 meses. Esto es posible debido a la adaptación por exposición previa a temperaturas de congelación.

Otro factor es la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biofilms en entornos con ambientes húmedos y ricos en nutrientes como las instalaciones de procesamiento de alimentos (Akrami-Mohajeri *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2022).

Identificación molecular. Los productos de PCR de la amplificación del gen 16S rRNA de las cepas aisladas se analizaron por electroforesis (Figura 11) obteniendo un fragmento de amplificación de 1492 pb en cada una de las cepas.

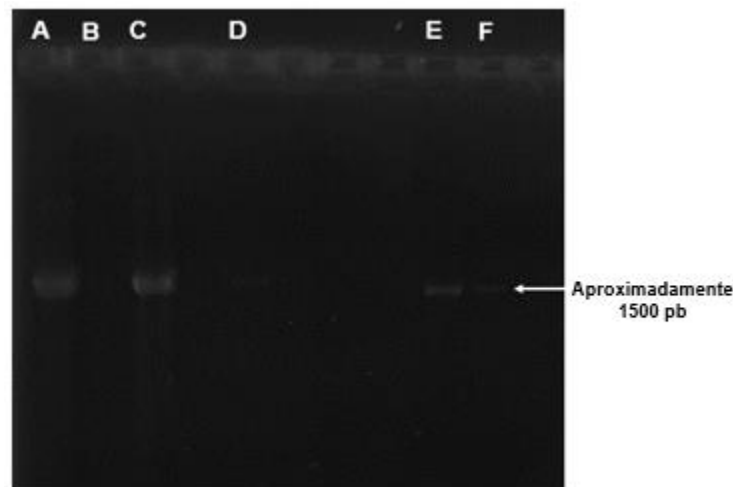


Figura 11. Fotografía de un gel de agarosa (1.5%) de amplificación del gen 16S rRNA a partir de productos de ADN. Carril A: Marcador, carril B: Control negativo, carril C: Control positivo *S. aureus*, carril D: *Lm 5*, carril E: *Lm 4*, carril F: *Lm 5*. Las amplificaciones de los carriles A-D se realizaron con los oligonucleótidos 8F y 1492R; las amplificaciones de los carriles E y F se realizaron con 8F y 1401. La flecha blanca indica el fragmento de amplificación de 1492 pb.

En la tabla 11 se resumen los resultados obtenidos en el análisis de secuenciación, y se confirma que, de las siete cepas, la cepa *Lm7* es *L. monocytogenes* con un porcentaje de identidad del 99.40% (con los primers 8F y 1492R) y 99.65% (con los primers 8F y 1401R).

Tabla 11. Resultados del análisis de secuenciación del gen 16S rRNA de productos de PCR de aislamientos de productos lácteos.

Cepa	Tamaño del amplicón en la PCR	Tamaño de la secuencia recibida	Resultado del Análisis en BLAST		
			Descripción	E value	Porcentaje de identidad
1	1492 pb	672	Sin similitud significativa	-	-
2	1492 pb	1814	Sin similitud significativa	-	-
3	1492 pb	474	<i>Enterobacter hormaechei</i> cepa e33 16S rRNA, secuencia parcial	2e -81	84.10%
4	1492 pb	1187	<i>Klebsiella aerogenes</i>	0	93.37%
5	1492 pb	1282	<i>Klebsiella oxytoca</i> cepa GCIPR3 16S rRNA	0	94.65%
6	1492 pb	1216	<i>Bacillus subtilis</i> cepa B106 16S rRNA	0	99.66%
7	1492 pb	1175	<i>Listeria monocytogenes</i> cepa PNUSAL000019 cromosoma	0	99.40%
7	1492 pb	1146	<i>Listeria monocytogenes</i> cepa PNUSAL000019 cromosoma	0	99.65%

De las cepas analizadas, 6 de ellas mostraron no tener similitud significativa con *L. monocytogenes* o indicaron pertenecer a otro género bacteriano; sin embargo, la identidad de estas cepas se comprobó mediante el análisis la presencia de tres genes específicos de *L. monocytogenes* (Tabla 15, Tabla 16). Por lo tanto, las 7 cepas aisladas correspondieron a *L. monocytogenes*. De acuerdo con Valecha y Posada (2022) pueden ocurrir errores de secuenciación del ADN, asociados a sesgos técnicos por la cobertura heterogénea del ADN, o el error puede ocurrir durante la lisis celular y extracción de ADN.

9.2. Capacidad de formación de biofilms

L. monocytogenes puede persistir en los entornos de producción de alimentos gracias a su capacidad para formar biofilms, pero su fenotipo de adhesión es heterogéneo entre cepas; sin embargo, los mecanismos exactos por los que algunos aislamientos se adhieren más que otros siguen sin estar claros (Mahoney *et al.*, 2022). En las cepas aisladas se observaron los tres tipos de biofilms, capacidad de formación débil, moderado y fuerte a las 24 h (Tabla 12).

Tabla 12. Tipos de biofilms formados por cepas control y *L. monocytogenes*

Cepa	Biofilm	
	DO	Tipo de biofilm
<i>S. epidermidis</i> 12228	0.046	Ausente
<i>S. aureus</i> 29213	0.301	Débil
<i>Lm</i> ATCC 7644	0.508	Moderado
<i>Lm</i> 1.1	0.455	Débil
<i>Lm</i> 1.2	0.421	Débil
<i>Lm</i> 10.1	0.419	Débil
<i>Lm</i> 1	0.765	Fuerte
<i>Lm</i> 2	0.310	Débil
<i>Lm</i> 3	0.675	Moderado
<i>Lm</i> 4	0.532	Moderado
<i>Lm</i> 5	0.777	Fuerte
<i>Lm</i> 6	0.520	Moderado
<i>Lm</i> 7	0.988	Fuerte

De acuerdo con Nilsson *et al.* (2011) la heterogeneidad en las propiedades de producción de biofilm entre cepas de *L. monocytogenes*, podría atribuirse a que las cepas del serotipo 1/2a suelen producir significativamente más biofilm. En nuestro estudio no se realizó el serotipado de las cepas obtenidas; sin embargo, se sabe que el serotipo 1/2a del linaje II está asociado con los alimentos. También mencionan que el ambiente influye en el nivel de producción de biofilm de cepas de *L. monocytogenes* independientemente de la tasa de crecimiento planctónico, y que esto puede manifestarse a partir de las presiones de selección a las que crece una cepa determinada óptimamente.

Di Ciccio *et al.* (2022) reportaron que las cepas que aislaron de cárnicos formaron biofilm moderado/fuerte, en porcentajes más altos que las que aislaron de lácteos. Esto contrasta con nuestros hallazgos, donde las 6 cepas aisladas de lácteos fueron formadoras de biofilm moderado/fuerte en comparación con las cepas control de lomo de cerdo, que formaron biofilms débiles.

9.3. Caracterización de AgNPs

UV-Vis. Esta técnica permite corroborar la formación de AgNPs en las síntesis llevadas a cabo debido a la aparición de una fuerte banda de resonancia plasmónica (Escobar, 2015; Yaseen *et al.*, 2023). En la figura 12 se aprecia el espectro UV-vis de las AgNPs de 1000 ppm y 250 ppm sintetizadas, con un pico de absorción máxima de 455 y 458 nm, respectivamente. Los picos de absorción obtenidos son muy similares a los reportados por Escobar (2015) y Summer *et al.* (2023), de 427 nm y 450 nm, respectivamente.

De acuerdo con Yaseen *et al.* (2023), la absorción de las AgNPs se vuelve más fuerte y nítida al aumentar la concentración de Ag^+ . En este sentido, si existe una concentración alta de AgNO_3 , la absorción máxima puede dar lugar a un desplazamiento a la derecha, lo que significa que el tamaño de las partículas aumentó y se formaron grandes agregados de Ag^+ (Sobczak-Kupiec *et al.*, 2011). Las variaciones en el pico de absorbancia no solo se relacionan con la concentración sino también con el tamaño de las partículas y las variables ambientales, como pH, temperatura, tiempo, radiación, oxígeno disuelto y los agentes de protección (Alzubaidi *et al.*, 2023).

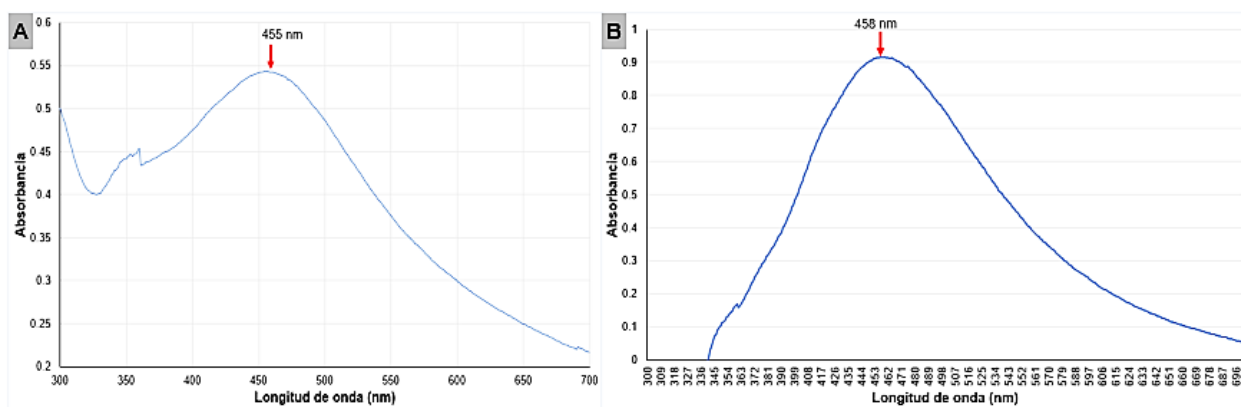


Figura 12. Espectros de absorción UV-Visible de AgNPs. A: Pico de absorción de AgNPs de 1000 ppm, situado en 455 nm. B: Pico de absorción de AgNPs de 250 ppm, situado en 458 nm.

Tamaño de partícula. Se obtuvo una distribución del tamaño de las AgNPs de 250 ppm de 0.09 μm que corresponde a 90 nm (Figura 13).

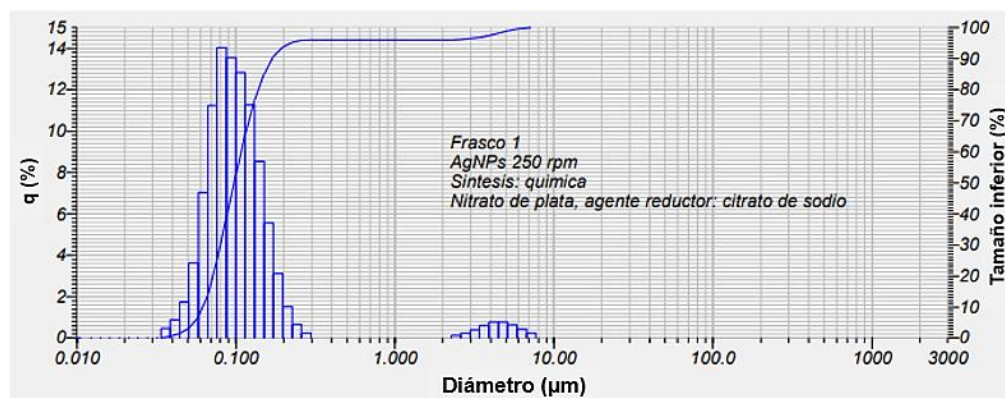


Figura 13. Distribución del tamaño de partícula de las AgNPs de 250 ppm.

Para que las AgNPs se consideren como NPs, deben tener un tamaño de entre 1-100 nm (Naganthran *et al.*, 2022), por lo que el tamaño de las AgNPs sintetizadas se posiciona dentro del rango. Muthulakshmi *et al.* (2022) reportan un tamaño similar de entre 26-100 nm. Así mismo, Escobar (2015) indican que la posición del pico de los espectros UV-vis está relacionada con el tamaño de partícula, citando tamaños de entre 60-80 nm en la posición 438 nm. Esto corresponde con nuestros hallazgos obteniendo un tamaño similar de 90 nm y un pico de 458 nm.

Por otro lado, el tamaño de partícula de las AgNPs de 1000 ppm se encontró entre 0.011 a 1433.47 μm (mediana) que corresponde a un rango de entre 11 nm y 1433 nm (Figura 14).

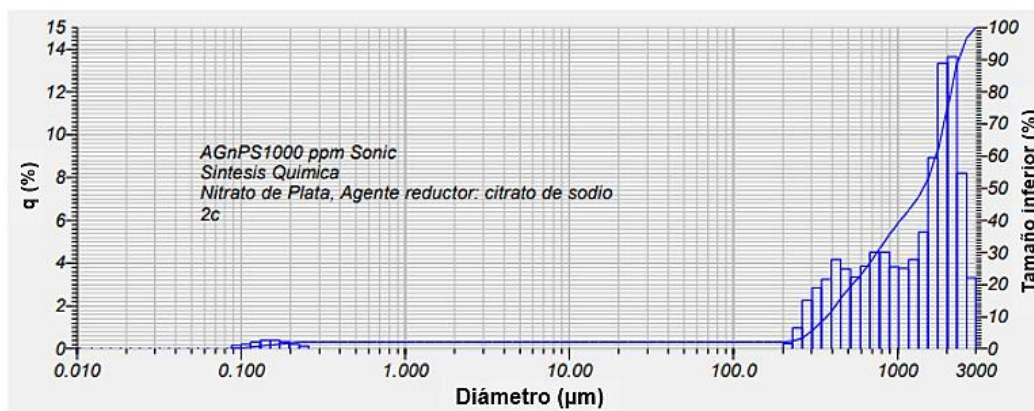


Figura 14. Distribución del tamaño de partícula de las AgNPs de 1000 ppm.

Se sabe que el efecto antimicrobiano de la plata mejora notablemente varias veces con la formulación nano debido al aumento de área superficie-volumen (Yaseen *et al.*, 2023). Sin embargo, Alsakhawy *et al.* (2022) reportan que AgNPs de 300 nm tuvieron mejor efecto que las de 75 nm (Halos de inhibición de 12.3 y 13.0 nm, respectivamente); por lo que mencionan que, pese a que la literatura indique que las AgNPs exhiben una actividad antimicrobiana dependiente del tamaño (mejor efecto NPs pequeñas), se puede concebir que no solo está relacionada al tamaño de partícula, sino con sus diversas características como la forma, entre otras.

La razón por la que las AgNPs de 1000 ppm sintetizadas en este estudio hayan tenido un tamaño mayor, puede deberse al uso de concentraciones altas de plata. Con respecto a esto, Mares (2015) reporta que a medida que la concentración de plata sea menor, el tamaño de NPs también será menor. En el caso de las AgNPs de 250 ppm, la concentración fue menor y el tamaño fue de 90 nm. Así mismo, Juárez-Maldonado *et al.* (2013) reportan tamaños de entre 300 nm a 1000 nm en AgNPs de 1000 y 10000 ppm. Esto se atribuye a la frecuencia de colisión, es decir, las partículas son fáciles de agregar si hay altas concentraciones de AgNO_3 , y pueden encontrarse coalesciendo dos o más NPs, formando una partícula más grande (Sobczak-Kupiec *et al.*, 2011; Mares *et al.*, 2015).

Para evitar la aglomeración de NPs, se sugiere el uso de agentes protectores o estabilizantes y en el caso de concentraciones altas de 250, 500 y 1000 ppm de AgNPs, se sugiere el ácido gálico (Naganthran *et al.*, 2022; Chauhan *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2015).

FT-IR. En la figura 15 se aprecian los espectros FT-IR que corresponden a las AgNPs de 1000 ppm y 250 ppm (línea negra y roja, respectivamente). Se observa una banda correspondiente al estiramiento del enlace entre O-H alrededor de 3307 cm^{-1} , el cual se relaciona con la reacción de los grupos -OH del citrato de sodio y los iones de Ag^+ . Se reportan picos similares alrededor de $3385,40\text{ cm}^{-1}$ a 3705 cm^{-1} poco similares a nuestro hallazgo (Alzubaidi *et al.*, 2023; Summer *et al.*, 2023). Se aprecia un estiramiento en el enlace - CH_2 a 2960 cm^{-1} y otro pico en 1633 y 1634 cm^{-1} que corresponde al estiramiento en el enlace $\text{C}=\text{O}$ (grupos carbonilo) de las

AgNPs de 1000 y 250 ppm, respectivamente; algunos reportes indican picos en 1743 cm^{-1} (Alzubaidi *et al.*, 2023). Por otro lado, aparece otro pico en 1218 cm^{-1} que indica el estiramiento en C-O por la presencia de Ag^+ según Summer *et al.* (2023) quienes identificaron picos cercanos en $1160\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$. También se identificó un pico en 584 cm^{-1} que, de acuerdo con Alzubaidi *et al.* (2023), corresponde al pico para el óxido de plata y en su estudio se observó a 518 cm^{-1} . Por otro lado, se aprecia un pico en 772 y 770.64 cm^{-1} que indica en estiramiento en el enlace C-H. En cuanto al espectro de AgNO_3 reveló una banda de absorción intensa en 1275.73 cm^{-1} similar a la que reportan Ronquillo-de Jesús *et al.* (2018) en 1376 cm^{-1} , la cual es característica del par ion $\text{Ag}^+ \text{NO}_3^-$. El espectro del citrato de sodio reveló una banda en 1387.13 cm^{-1} que de acuerdo con Escobar (2015), pertenece a las oscilaciones del grupo C-OH que pueden aparecer de entre 1386 y 1064.62 cm^{-1} . En 906.91 cm^{-1} aparece una banda que puede corresponder al estiramiento del C-C, las cuales no aparecen en los espectros de las AgNPs sintetizadas (Escobar, 2015).

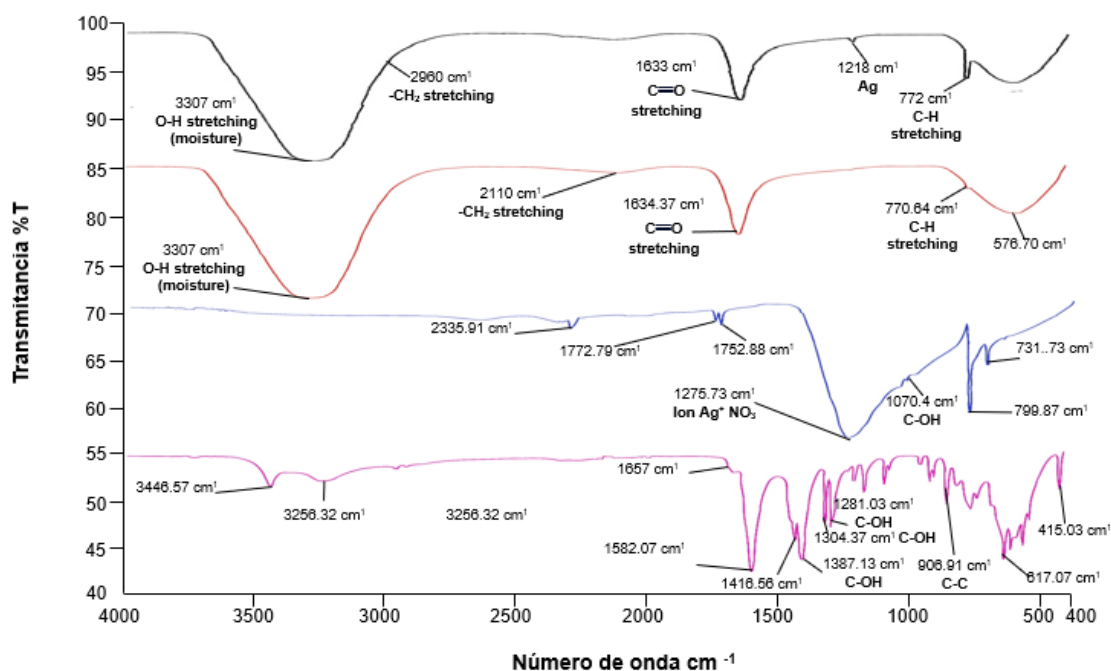


Figura 15. Espectros FT-IR. El espectro color negro corresponde a las AgNPs de 1000 ppm, el color rojo a las AgNPs de 250 ppm, el azul al AgNO_3 y el rosa al citrato de sodio.

9.4. Determinación del efecto antimicrobiano de las AgNPs

Sensibilidad antimicrobiana. En la Figura 16 se aprecia que con 25, 50 y 100 ppm de AgNPs no se logró inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en agar. Por el contrario, en las cepas control *E. coli* y *S. aureus* se obtuvieron halos de inhibición de entre 5.0 y 5.5 mm con 25 y 50 ppm y de 6.0 mm con 100 ppm. Con ello se comprueba que *L. monocytogenes* es un patógeno resistente.

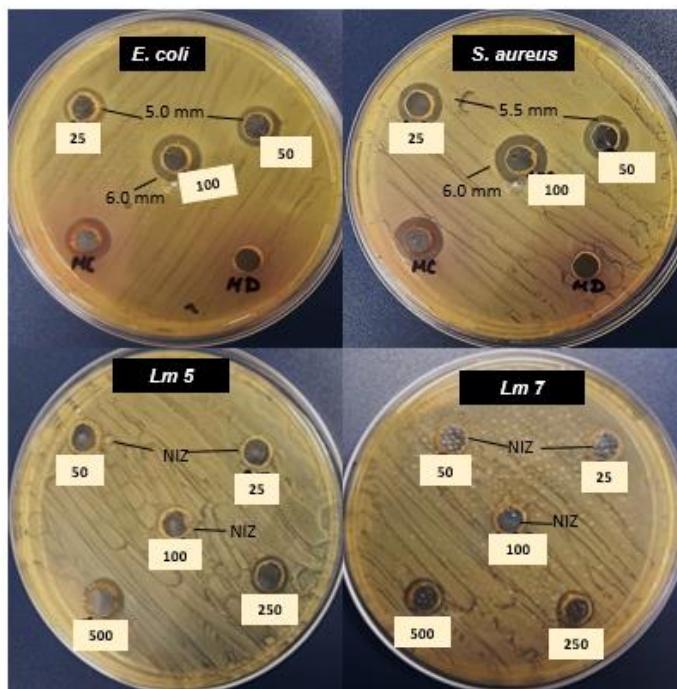


Figura 16. Halos de inhibición que indican la actividad antibacteriana de AgNPs (25, 500 y 100 ppm) contra patógenos. NIZ—No hay zona de inhibición. (Los datos representan la media de dos réplicas, en mm).

En la figura 17 se aprecia que en *Lm5* con 250 ppm no se observó zona de inhibición, pero con 500 y 1000 ppm se obtuvieron halos de 2.5 y 3.5 mm, respectivamente. En cuanto a *Lm7* los halos fueron de 2.5, 4.0 y 5.0 mm con 250, 500 y 1000 ppm, respectivamente. Los resultados de este ensayo indicaron que las AgNPs mostraron actividad antibacteriana con las tres concentraciones, con mejor efecto con las de 1000 ppm.

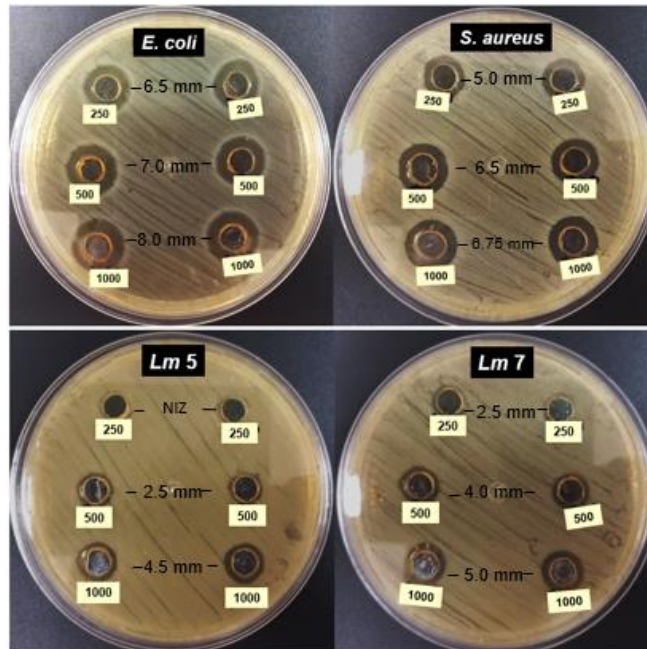


Figura 17. Halos de inhibición que indican la actividad antibacteriana de AgNPs (250, 500 y 1000 ppm) contra patógenos. NIZ—No hay zona de inhibición. (Los datos representan la media de dos réplicas, en mm).

Es evidente que las bacterias control, fueron más susceptibles a las AgNPs que *L. monocytogenes*. Sanchooli *et al.* (2018) reportan zonas de inhibición de 9.16 ± 0.28 mm en *L. monocytogenes* utilizando AgNPs de 630 ppm, los cuales son más grandes que los halos observados en este trabajo. Sin embargo, los halos observados solo nos brindan información cualitativa de acuerdo con Jiang (2011), por lo que el efecto de las AgNPs también se comprobó mediante la obtención de la CMI en el método de macrodilución.

Determinación de CMI. En la figura 18 se aprecian los patrones de color y turbidez en el ensayo de macro dilución de las AgNPs de 2000 ppm, donde después de 24 h de incubación a 37°C, se observó turbidez únicamente en los tubos de los controles positivos. No se observó turbidez en ninguno de los tubos con AgNPs. Esto nos indica que las AgNPs inhiben el crecimiento bacteriano de cepas de *L. monocytogenes* ATCC y aisladas de productos lácteos.

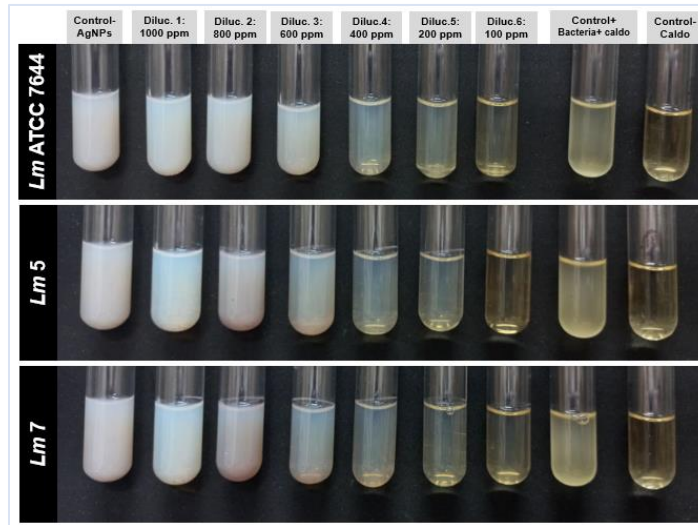


Figura 18. Patrones de coloración en tubos de macro dilución con AgNPs de 2000 ppm. Existe cambio en la apariencia de turbidez y color, esto es debido al aspecto lechoso de la solución de AgNPs más no deriva de crecimiento bacteriano.

Por otro lado, en la figura 19 se muestran los patrones de turbidez de las AgNPs de 2000 ppm probadas únicamente en *Lm7* llegando a una concentración más baja (12.5 ppm de AgNPs), donde tampoco se observó turbidez.

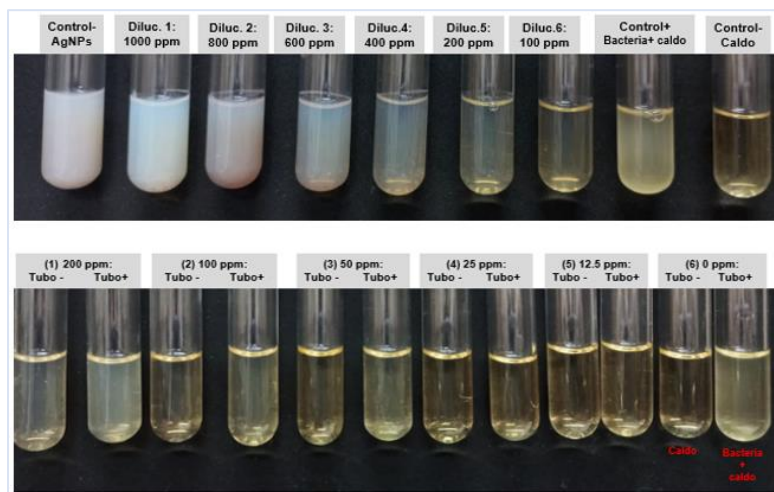


Figura 19. Patrones de turbidez y coloración en tubos de la prueba de macro dilución con AgNPs de 2000 ppm. Cepa *Lm7*.

En la figura 20 se grafica los resultados arrojados por el densitómetro. Se aprecia que en ninguna de las concentraciones de AgNPs, hubo crecimiento bacteriano.

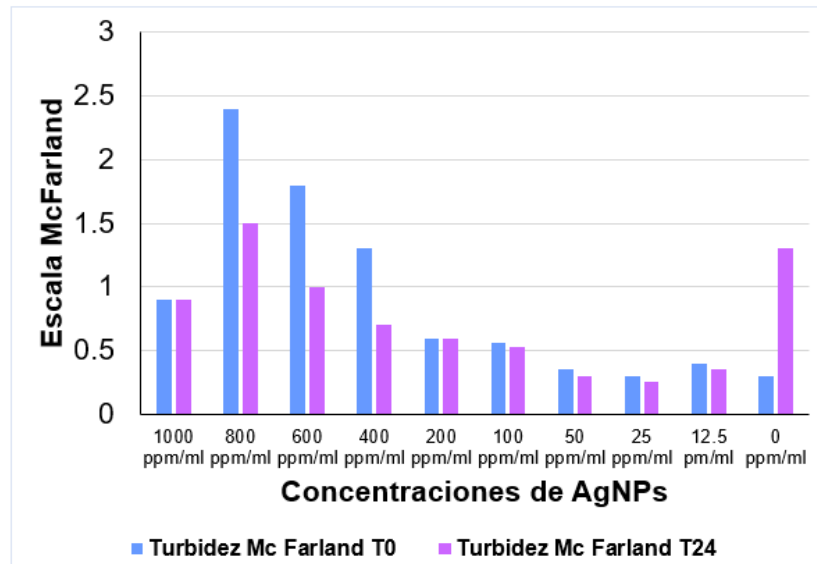


Figura 20. Turbidez McFarland para detectar crecimiento bacteriano en el ensayo de macro dilución con AgNPs de 2000 ppm. La cepa probada *Lm 7*.

En la figura 21 se aprecian los patrones de turbidez y coloración en el ensayo de macro dilución utilizando las AgNPs de 250 ppm sobre *Lm7*. De acuerdo con la turbidez, hubo crecimiento bacteriano a partir de la aplicación de la segunda dilución. Por lo tanto, la CMI de las AgNPs en este ensayo fue de 125 ppm.

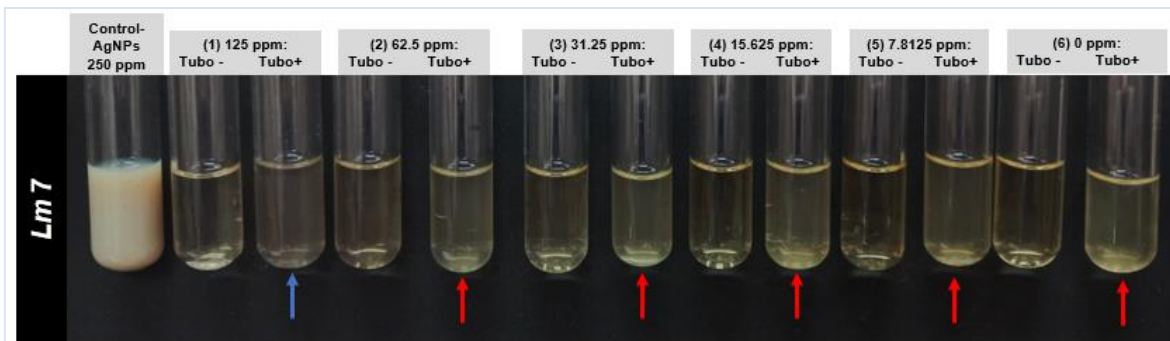


Figura 21. Patrones de turbidez y coloración en tubos de la prueba de macro dilución con AgNPs de 250 ppm. La flecha azul indica el punto de corte que corresponde a una MIC de 125 ppm. Las flechas rojas indican los tubos donde hubo crecimiento bacteriano.

Se corroboró la turbidez a través del densitómetro y se confirmó que hubo crecimiento bacteriano a partir de 62.5 ppm/mL (Figura 22).

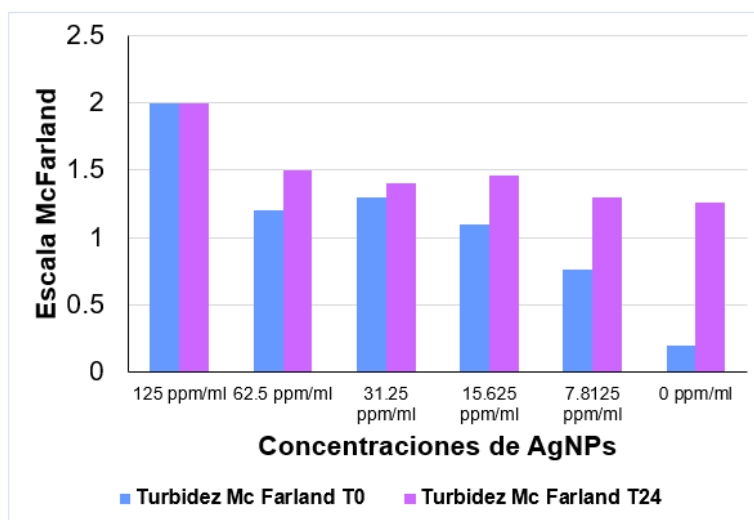


Figura 22. Turbidez McFarland para detectar crecimiento bacteriano en el ensayo de macro dilución con AgNPs de 250 ppm/mL. La cepa probada *Lm 7*.

Se ha reportado una CMI de AgNPs sobre *L. monocytogenes* de 220 ppm (Muthulakshmi *et al.*, 2022) y de 1000 ppm (Sanchooli *et al.*, 2018). En este trabajo la CMI de AgNPs fue más baja que las reportadas, logrando la inhibición bacteriana con 125 ppm.

9.5. Efecto de las AgNPs sobre los biofilms de *L. monocytogenes*

El efecto de las AgNPs se evaluó sobre los biofilms de *L. monocytogenes*, a través de dos ensayos diferentes. Los porcentajes de formación de biofilms obtenidos en el Ensayo 1, se describen en la Figura 23.

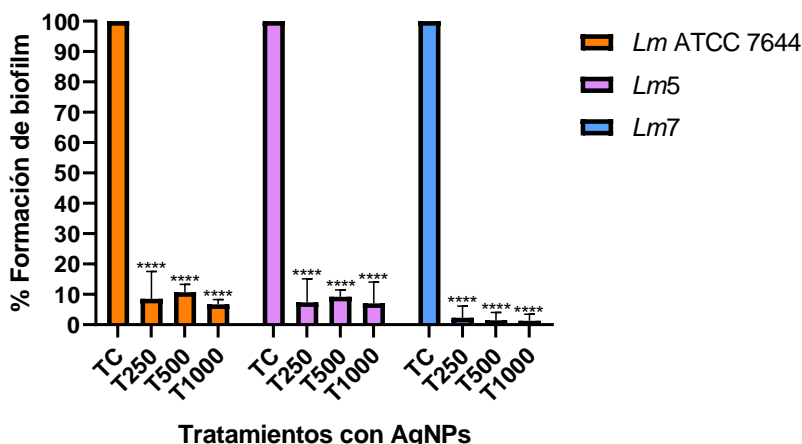


Figura 23. Porcentaje de formación de biofilms de *L. monocytogenes* en el Ensayo 1 (Aplicación de AgNPs a las 0 h. de formación de biofilms). Las barras incluyen la media de cuatro réplicas, las líneas encima de la barra representan el error estándar. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

En *Lm ATCC 7644* hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) de las concentraciones de AgNPs con respecto al control, obteniendo porcentajes de formación de biofilms del 8.53%, 10.67% y 7%, con las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm, respectivamente. Analizando entre concentraciones, no existió diferencia ($P > 0.05$). Con respecto a *Lm5*, se obtuvieron porcentajes de biofilm del 7%, 9.23% y 7.06% con la aplicación de AgNPs de 250, 500 y 1000 ppm ($P < 0.05$); sin embargo, no hubo diferencias entre las diferentes concentraciones ($P > 0.05$).

En el caso de *Lm7*, esta cepa obtuvo porcentajes de formación de biofilms del 2.25%, 1% y 1.27% con las AgNPs de 250, 500 y 1000 ppm, respectivamente. Obteniendo diferencias significativas con respecto al control ($P < 0.05$).

Los biofilms formados por las tres cepas en el TC fueron débiles, con DO de 0.296 ± 0.01 , 0.343 ± 0.01 y 0.340 ± 0.07 por *Lm ATCC 7644*, *Lm5* y *Lm7*, respectivamente. Si bien con la aplicación de AgNPs en las diferentes

concentraciones, se obtuvieron porcentajes de formación de biofilms de entre 1% y ≈10%, las DO obtenidas en cada uno de los tratamientos fueron <0.120. De acuerdo con Fan *et al.* (2020), aquellas DO menores a este valor corresponden a biofilms ausentes. Por lo tanto, con la aplicación de AgNPs de 250, 500 y 1000 ppm se logró inhibir el crecimiento bacteriano, obteniendo un biofilm ausente en todas las cepas de *L. monocytogenes* (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados de la capacidad de formación de biofilms en el Ensayo 1.

Cepa	Tipo de biofilms formados por tratamiento			
	TC	T250	T500	T1000
<i>Lm</i> ATCC 7644	Débil	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Lm</i> 5	Débil	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Lm</i> 7	Débil	Ausente	Ausente	Ausente

Los porcentajes obtenidos en el Ensayo 2 donde la aplicación de AgNPs se realizó a las 24 h. de formación de biofilms se describen en la Figura 24.

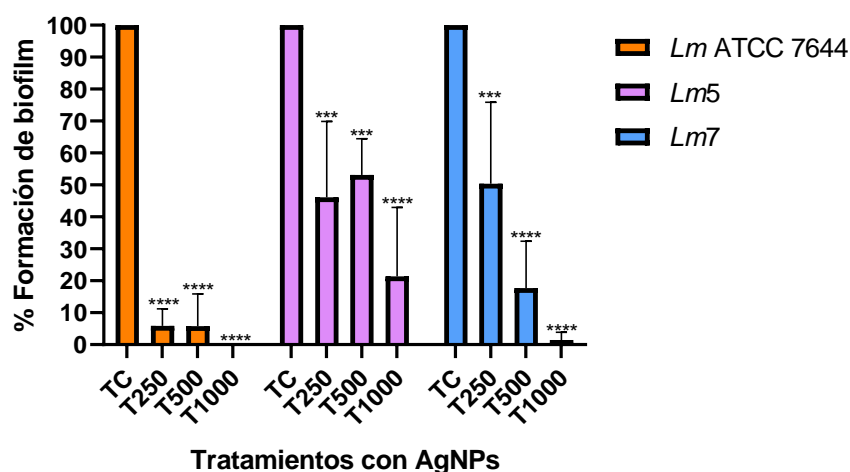


Figura 24. Porcentaje de formación de biofilms de *L. monocytogenes* en el Ensayo 2 (Aplicación de AgNPs a las 24 h. de formación de biofilms). Las barras incluyen la media de cuatro réplicas, las líneas encima de la barra representan el error estándar. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

En la cepa *Lm* ATCC 7644 se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) de las tres concentraciones de AgNPs con respecto al control, obteniendo porcentajes de formación de biofilms del 5.89%, 6% y 0%, con las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm, respectivamente. Pero no existió diferencia entre dichas concentraciones ($P > 0.05$).

Así mismo, *Lm5* mostró diferencias ($P < 0.05$) con respecto al control más no entre concentraciones ($P > 0.05$). Obteniendo porcentajes de biofilm del 46.14%, 53% y 21% con las AgNPs de 250, 500 y 1000 ppm, respectivamente.

Finalmente, *Lm7* mostró porcentajes de formación de biofilms del 50.37%, 18% y 1% con las concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm, respectivamente, existiendo diferencias significativas ($P < 0.05$). En este caso se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de AgNPs de 250 y 500 ppm ($P < 0.05$).

Los biofilms formados por la cepa *Lm* ATCC 7644 en el TC fue débil, con una DO de 0.390 ± 0.05 . Con la aplicación de las tres concentraciones de AgNPs se logró inhibirlo, obteniendo un biofilm ausente ($DO < 0.120$) de acuerdo con Fan *et al.* (2020).

La cepa *Lm5* también formó un biofilm débil en el TC, con una DO de 0.439 ± 0.05 . Este tipo de biofilm permaneció como débil al añadir las AgNPs de 250 y 500 ppm, obteniendo DO de 0.202 ± 0.1 y 0.233 ± 0.04 , respectivamente; sin embargo, con las AgNPs de 1000 ppm se logró inhibir por completo dicho biofilm ($DO < 0.120$).

Con respecto a *Lm7*, esta cepa formó un biofilm fuerte con una DO de 0.741 ± 0.05 en el TC. Con la aplicación de AgNPs de 250 y 500 ppm, sucedió lo mismo que con la cepa anterior, permaneciendo un biofilm débil con DO de 0.373 ± 0.1 y 0.132 ± 0.05 , respectivamente. Al añadir las AgNPs de 1000 ppm, se logró inhibir la formación de este, obteniendo un biofilm ausente ($DO < 0.120$).

El mejor efecto se logró con AgNPs de 1000 ppm, con la cual se pudo inhibir la formación de un biofilm de 24 h. (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados de la capacidad de formación de biofilms en el ensayo 2.

Cepa	Tipo de biofilms formados por tratamiento			
	TC	T250	T500	T1000
<i>Lm</i> ATCC 7644	Débil	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Lm5</i>	Débil	Débil	Débil	Ausente
<i>Lm7</i>	Fuerte	Débil	Débil	Ausente

Muthulakshmi *et al.* (2022) reportan que con AgNPs de 50 y 100 ppm, obtuvieron porcentajes de formación de biofilms de *L. monocytogenes* del 33% y 45.5%, respectivamente. En este trabajo se obtuvieron porcentajes de formación de biofilm más bajos e incluso inhibiendo por completo el biofilm, considerando concentraciones más altas. En este estudio las AgNPs de 250 ppm fueron capaces de evitar la formación de biofilms.

Fontecha-Umaña *et al.* (2020), probaron AgNPs de 500, 600 y 800 ppm sobre biofilms de *L. monocytogenes*. Observando que en 500 ppm hubo un porcentaje de formación de biofilms del 0%, mientras que con 800 ppm una adhesión de 1.01 log UFC/cm². Las AgNPs de 600 ppm resultaron ser solo medio efectivas, esto coincide con este trabajo donde las AgNPs de 500 ppm no eliminaron un biofilm débil de 24 h. de formación. Lo anterior lo atribuyeron a que la relación entre la destrucción bacteriana y la concentración antimicrobiana no siempre es lineal.

9.6. Presencia de genes de formación de biofilms: *inIA*, *inIB* y *luxS*

Se determinó la presencia de los genes *inIA* e *inIB* específicos de la especie, así como el gen *luxS*. En la figura 25 se observan los productos de amplificación del gen *inIA* con un fragmento de 145 pb de acuerdo con Tiong y Muriana (2016). Para este caso, amplificaron las cepas *Lm5*, *Lm6* y *Lm7*; sin embargo, del mismo modo tres cepas (*Lm1*, *Lm3* y *Lm4*) amplificaron fragmentos de 140 pb.

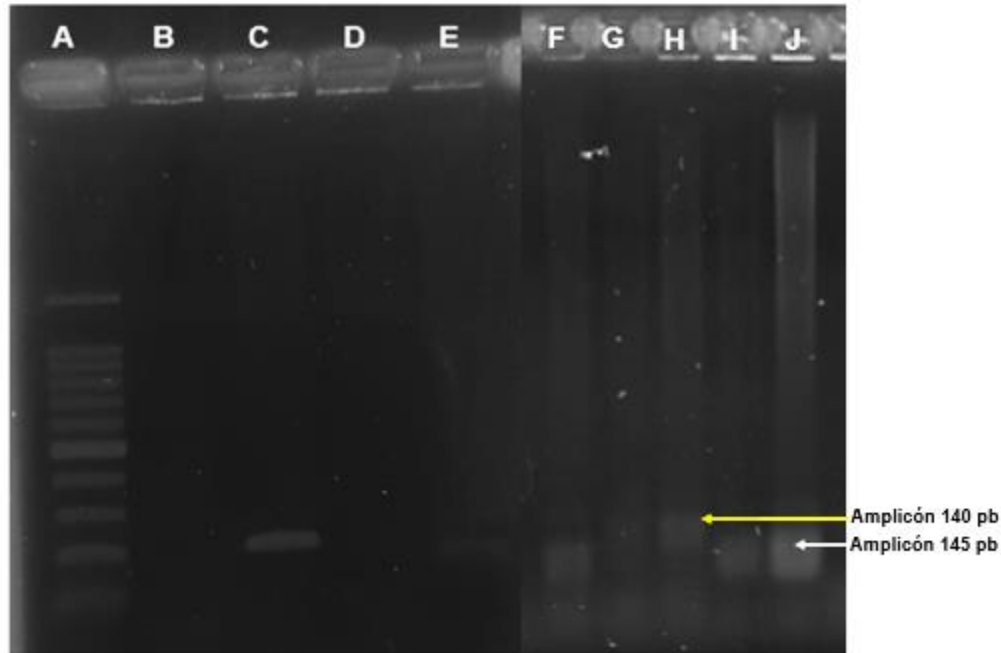


Figura 25. Fotografía de un gel de agarosa (1.5%) de amplificación del gen *inIA*. Carril A: Marcador de peso molecular 100 pb, carril B: Control negativo, carril C: *Lm1*, carril D: *Lm2* y carril E y F: *Lm6*, carril G: *Lm3*, carril H: *Lm4*, carril I: *Lm5*, carril J: *Lm7*. La flecha blanca indica el fragmento de amplificación de 145 pb de acuerdo con Tiong y Muriana (2016). La flecha amarilla indica fragmentos de 140 pb.

El éxito de la infección por *L. monocytogenes* depende de la expresión de *inIA* y *actA*, y las proteínas internalina A y ActA también juegan un papel en la estructura de los biofilms de este patógeno. Existen reportes donde el gen *inIA* se expresa en mayor medida en células planctónicas que en biofilms maduros (24 h.), lo que indica que desempeña un papel importante en los pasos iniciales de la formación de biofilms de *L. monocytogenes* (Wang *et al.*, 2022).

Por otro lado, el gen *inB* se identificó por la amplificación de un fragmento de 150 pb (Figura 26) de acuerdo con Tiong y Muriana (2016). Las cepas que amplificaron este gen fueron *Lm* 1.1, 1.2 y 10.1 (origen lomo de cerdo), *Lm* 4, 5, 6 y 7.

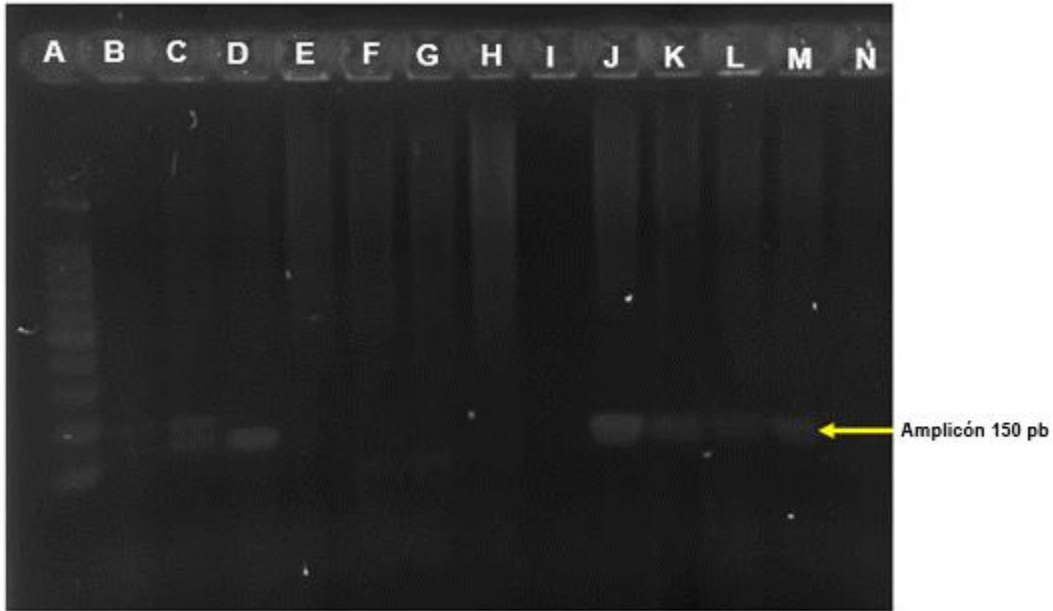


Figura 26. Fotografía de un gel de agarosa (1.5%) de amplificación del gen *inlA* e *inB*. Carril A: Marcador de peso molecular 100 pb. Gen *inlA*: Carril B: Control negativo, carril C y D: Control positivo *Lm* 4 y 5 respectivamente, carril E, F, G y H: *Lm* 1, *Lm* 1.2, *Lm* 10.1, *Lm* ATCC 7644, respectivamente. Gen *inB*: Carril I: Control negativo, carril J, K, L, M, N: *Lm* 1.1, *Lm* 1.2, *Lm* 10.1, *Lm* ATCC 7644, respectivamente. La flecha amarilla indica el fragmento de 150 pb.

El gen *inB* codifica la internalina B, que es una proteína unida a la superficie involucrada en la invasión de células por *Listeria*. Además, se ha identificado este gen en aquellas cepas productoras de biofilm fuerte, y ha estado ausente en aquellas productoras débiles, por lo que se considera que tiene un papel importante en la formación de biofilms (Park *et al.*, 2022).

Finalmente, la presencia del gen *luxS* se confirmó por la amplificación de un fragmento de 208 pb (Figura 27) de acuerdo con Warke *et al.* (2017). Este gen estuvo presente en las cepas *Lm* ATCC 7644, *Lm* 1.1, 1.2 y 10.1; y *Lm*1, *Lm*4, *Lm*5, *Lm*6 y *Lm*7.

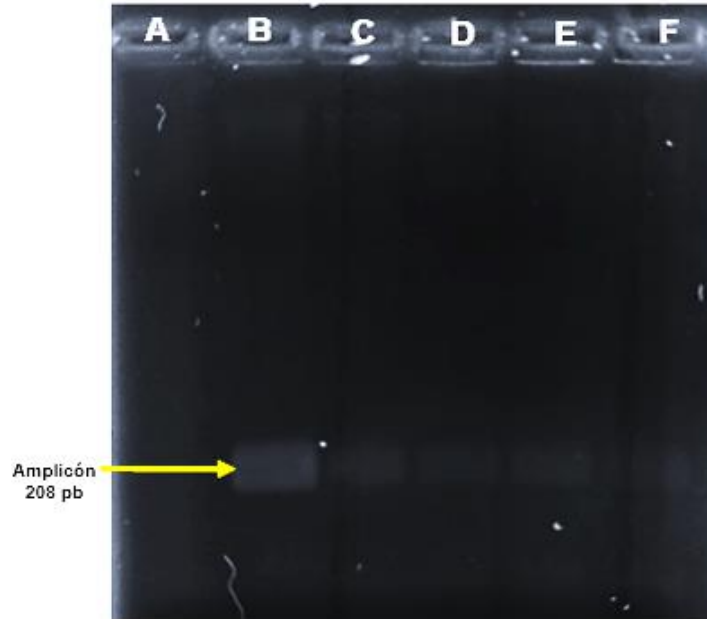


Figura 27. Fotografía de un gel de agarosa (1.5%) de amplificación del gen *luxS*. Carril A: Control negativo, carril B: Control positivo *Lm7*, carril C: *Lm 1.1*, carril D: *Lm 1.2*, carril E: *Lm 10.1*, carril F: *Lm ATCC 7644*. Las flechas amarillas indican el fragmento de amplificación de 208 pb.

En la tabla 15 se describen las secuencias de los productos de PCR, donde el gen *inIA* en las cepas *Lm5* y *Lm7* se confirmó como el gen de la internalina A; mientras que, los genes *inIB* y *luxS* para estas cepas muestran similitud con la secuencia de *L. monocytogenes*.

Tabla 15. Resultados del análisis de secuencias de productos de PCR purificados.

Cepa	Gen	Tamaño del amplicón en la PCR	Tamaño de la secuencia recibida	Resultado del Análisis en BLAST		
				Descripción	E value	Porcentaje de identidad (%)
<i>Lm5</i>	<i>inIA</i>	145 pb	259	<i>Listeria monocytogenes</i> cepa P06-020 gen de la internalina A (<i>inIA</i>), cd completo	7e -43	98.15%
<i>Lm5</i>	<i>inIB</i>	150 pb	618	<i>Listeria monocytogenes</i> strain AUF chromosome, complete genome	3e -49	99.14%

Tabla 15. Continuación.

<i>Lm5</i>	<i>luxS</i>	208 pb	630	<i>Listeria monocytogenes</i> strain AUF chromosome, complete genome	3e -51	94.37%
<i>Lm7</i>	<i>inIA</i>	145 pb	473	<i>Listeria monocytogenes</i> cepa P06-020 gen de la internalina A (<i>inIA</i>), cd completo	1e -47	97.48%
<i>Lm7</i>	<i>inIB</i>	150 pb	468	<i>Listeria monocytogenes</i> strain AUF chromosome, complete genome	1e -47	98.28%
<i>Lm7</i>	<i>luxS</i>	208 pb	538	-	-	-

En la tabla 16 se resumen los resultados de los genes amplificados por cepa de estudio y se muestra la capacidad de formación de biofilm de cada una de ellas. Se apreció que aquellas cepas formadoras de biofilm fuerte y moderado, contaron con la presencia de los tres genes.

Tabla 16. Capacidad de formación de biofilm y presencia de genes en cepas de *L. monocytogenes*.

Cepa	Biofilm		Genes		
	DO	Tipo de biofilm	<i>inIA</i>	<i>inIB</i>	<i>luxS</i>
<i>Lm</i> ATCC 7644	0.508	Moderado	-	-	+
<i>Lm</i> 1.1	0.455	Débil	-	+	+
<i>Lm</i> 1.2	0.421	Débil	-	+	+
<i>Lm</i> 10.1	0.419	Débil	-	+	+
<i>Lm</i> 1	0.765	Fuerte	+	-	+
<i>Lm</i> 2	0.310	Débil	-	-	-
<i>Lm</i> 3	0.675	Moderado	+	-	-
<i>Lm</i> 4	0.532	Moderado	+	+	+
<i>Lm</i> 5	0.777	Fuerte	+	+	+
<i>Lm</i> 6	0.520	Moderado	+	+	+
<i>Lm</i> 7	0.988	Fuerte	+	+	+

El símbolo “+” indica la presencia de un gen, el símbolo “-” indica la ausencia de un gen.

No todas las cepas tuvieron los genes que codifican para internalinas específicas de *L. monocytogenes*; sin embargo, Vilchis-Rangel *et al.* (2019), mencionan que puede haber una expresión deficiente o ausencia de los genes *inIA* e *inIB*.

De acuerdo con Bonsaglia *et al.* (2014) el gen *inIA*, además de codificar internalina (InIA), parece desempeñar un papel en la unión a la superficie, y la adhesión de las bacterias a las superficies se ve afectada por las propiedades fisicoquímicas del medio ambiente. Se ha reportado que los niveles de *inIA* varían mucho entre cepas y serotipos de *L. monocytogenes*, y que se observan diferencias en biofilms cultivados en diferentes superficies (vidrio, acero inoxidable y politetrafluoroetileno) (Toliopoulos y Giaouris, 2023).

El gen *inIA* puede estar completo, truncado, entre otros. En un estudio de Mahoney *et al.* (2022), reportan que los aislamientos con *inIA* truncado tuvieron una adhesión media más alta (DO 0.52 ± 0.15). Esto coincide con Di Ciccio *et al.* (2022), quienes mencionan que los truncamientos de *inIA* mejoran significativamente la formación de biofilms; estos truncamientos suelen ser comunes en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos. En este estudio no se analizó los genotipos de *inIA*, pero sí se observó su presencia.

A diferencia de lo reportado por Di Ciccio *et al.* (2022), el gen *inIA* sí estuvo presente en cepas que formaron biofilms débiles; sin embargo, su presencia fue mayor en aquellas cepas que formaron biofilms moderados y fuertes. Esto coincide con los hallazgos de esta investigación, donde las cepas *Lm1*, *Lm3*, *Lm4*, *Lm5*, *Lm6* y *Lm7* tuvieron el gen *inIA* y formaron biofilm moderado y fuerte.

Se ha confirmado que la adherencia de *L. monocytogenes* en superficies de vidrio puede verse reforzada por una actividad sinérgica de las proteínas de superficie InIA e InIB codificadas por *inIA* e *inIB*, respectivamente (Tiong y Muriana, 2016).

Por otro lado, el desarrollo y la maduración de biofilms requieren mecanismos celulares complejos que implican la comunicación célula-célula. En *L. monocytogenes* la detección de QS es ejecutada por el AI-2 controlado por el gen *luxS* y pequeños péptidos, por lo que este gen es esencial e influye en la regulación y en la arquitectura de los biofilms de *L. monocytogenes* y de otras bacterias (Wang *et al.*, 2022; Bonsaglia *et al.*, 2014).

Camargo *et al.* (2016) detectaron el gen *luxS* en *Lm* ATCC 7644 y esta produjo un biofilm significativamente mayor que las cepas silvestres analizadas las cuales no fueron positivas al gen. En nuestro estudio, el gen *luxS* estuvo presente en dicha cepa y en las aisladas de lácteos.

Existen algunos resultados poco concluyentes como los citados por Bonsaglia *et al.* (2014), donde el gen *luxS* estuvo presente en 25/32 cepas (78.1%). En su estudio, de igual forma observaron que las cepas de *L. monocytogenes* que albergan el gen *luxS* no siempre produjeron un biofilm, pero las cepas formadoras de biofilm fuerte sí tuvieron el gen, por lo que sería importante analizar la expresión.

Kaptchouang Tchatchouang *et al.* (2022) analizaron aislamientos de carne, leche, heces de ganado y agua. Todos sus aislamientos formaron biofilms moderados/fuertes y 9/25 aislamientos de muestras de alimentos tuvieron la presencia del gen *luxS*. Estos reportes indican la importancia de dicho gen en la formación de biofilms.

CONCLUSIONES

L. monocytogenes estuvo presente únicamente en los productos lácteos, logrando el aislamiento de siete cepas, cuatro a partir de helado y tres a partir de queso ranchero. De estas cepas, *Lm4*, *Lm5*, *Lm6*, *Lm7* formaron biofilms moderados/fuertes y tuvieron los tres genes de estudio; sin embargo, *Lm1* y *Lm3* presentaron solo algunos de ellos y del mismo modo formaron biofilm fuerte/moderado. La cepa *Lm2* no tuvo ninguno de los genes y formó biofilm débil, por lo que se sugiere que estos genes podrían estar asociados con el desarrollo de un biofilm moderado o fuerte, pero esto también puede depender de otros factores. Con los resultados descritos, se determinó que se puede inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* y evitar la formación de biofilms con AgNPs de 125 ppm. Por otro lado, bajo las condiciones de este experimento se comprobó que un biofilm de *L. monocytogenes* de 24 h. puede eliminarse utilizando AgNPs a 1000 ppm. En conclusión, las AgNPs pueden utilizarse como una estrategia para evitar la formación de biofilms de *L. monocytogenes* o para eliminarlos, incluso en aquellas

cepas que son formadoras de moderados o fuertes y que poseen genes asociados a la formación de biofilm.

LITERATURA CITADA

- Abebe, E., Gugsu, G. & Ahmed, M. (2020). Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, 2020 (4674235): 1–19. <https://doi.org/10.1155/2020/4674235>
- Abouloifa, H., Hasnaoui, I., Ben Slima, S., Rokni, Y., Gaamouche, S., Trabelsi, I., Bellaouchi, R., Ghabbour, N., Ben, R., Jaouadi, B., Saalaoui, E. & Asehraou, A. (2022). Bio-preservation Effect of Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* S61 Against *Rhodotorula glutinis* and *Listeria monocytogenes* in Poultry Meat. *Current Microbiology*, 79 (8): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02923-4>
- Adamu, S.D. (2022). Effect of locally sourced prebiotics ingredients on the proximate composition and sensory attributes of ice cream. *Sagbama Journal of Science and Technical Education*, 1 (1): 1-8. ISSN (Print): 2955-0939 (Online): 2955-0947
- Akbarizadeh, M.R., Sarani, M. & Darijani, S. (2022). Study of antibacterial performance of biosynthesized pure and Ag-doped ZnO nanoparticles. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 33 (3): 613-621. <https://doi.org/10.1007/s12210-022-01079-4>
- Akrami-Mohajeri, F., Derakhshan, Z., Ferrante, M., Hamidiyan, N., Soleymani, M., Conti, G. O. & Tafti, R. D. (2018). The prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016). *Food Chemical Toxicology*, 114: 141-144. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.006>
- Alonso, F.A. & Rodríguez, E.R. (2023). Algunos aspectos de la industria del queso en México. *Entorno Ganadero*, 21 (120): 67-75. ISSN: 2395-9592.
- Alonso, A. (2018). Métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria. España: Universidad Autónoma de Oviedo. Tesis máster: 1-53.
- Alsakhawy, S.A., Baghdadi, H.H., El-Shenawy, M.A. & El-Hosseiny, L.S. (2022). Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Phytosynthesized by Citrus Fruit Peel Extracts. *BioNanoSci*, 12 (4):1106-1115. <https://doi.org/10.1007/s12668-022-01030-9>

- Al-Shabib, N.A., Husain, F.M., Nadeem, M., Khan, M.S., Al-Qurainy, F., Alyousef, A.A., Arshad, M., Khan, A., Khan, J.M., Alam, P., Albalawi, T. & Shahzad, S.A. (2020). Bio-inspired facile fabrication of silver nanoparticles from *in vitro* grown shoots of *Tamarix nilotica*: explication of its potential in impeding growth and biofilms of *Listeria monocytogenes* and assessment of wound healing ability. Royal Society Oh Chemistry, 10 (50): 30139-30149. DOI: 10.1039/D0RA04587J
- Alzubaidi, A.K., Al-Kaabi, W.J., Ali, A.A., Albukhaty, S., Al-Karagoly, H., Sulaiman, G.M., Asiri, M. & Khane, Y. (2023). Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Flaxseed Extract and Evaluation of Their Antibacterial and Antioxidant Activities. Applied Sciences, 13 (4): 2182-2195. <https://doi.org/10.3390/app13042182>
- Ahmad, S. A., Das, S. S., Khatoon, A., Ansari, M. T., Afzal, M., Hasnain, M. S. & Nayak, A. K. (2020). Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. Materials Science for Energy Technologies, 3: 756-769. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.09.002>
- Araujo-Cuevas, C.A. (2019). Formación de biofilms por bacterias. España: Universidad de Sevilla. Trabajo fin de grado Biología. p.30.
- Bai, X., Nakatsu, C.H. & Bhunia, A.K. (2021). Bacterial Biofilms and Their Implications in Pathogenesis and Food Safety. Foods, 10 (9): 2117-2143. doi: 10.3390/foods10092117.
- Banerji, R., Karkee, A., Kanojiya, P., Patil, A. & Saroj, S.D. (2021). Bacterial communication in the regulation of stress response in *Listeria monocytogenes*. LWT-Food Science and Technology, 154 (112703): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112703>
- Belluco, S., Losasso, C., Patuzzi, I., Rigo, L., Conficoni, D., Gallochio, F., Cibir, V., Catellani, P., Segato, S. & Ricci, A. (2016). Silver As Antibacterial toward *Listeria monocytogenes*. Frontiers in Microbiology, 7 (307): 1-9. doi: 10.3389/fmicb.2016.00307
- Bodie, A.R., O'Bryan, C.A. & Olson, E.G., Ricke, S.C. (2023). Natural Antimicrobials for *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meats: Current Challenges and Future

Prospects. Microorganisms, 11 (5): 1301-1317.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11051301>

- Bonsaglia, E.C.R., Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J.P., Tsunemi, M.H. & Rall, V.L.M. (2014). Production of Biofilm by *Listeria monocytogenes* in Different Materials and Temperatures. Food Control, 35 (1): 386-391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023>
- Borena, B. M., Dilgasa, L., Gebremedhin, E. Z., Sarba, E. J., Marami, L. M., Kelbesa, K. A. & Tadese, N. D. (2022). *Listeria* species occurrence and associated risk factors and antibiogram of *Listeria Monocytogenes* in milk and milk products in Ambo, Holeta, and Bako towns, Oromia Regional State, Ethiopia. Veterinary Medicine International, 2022 (5643478): 1-11. doi: 10.1155/2022/5643478.
- Bourguignon, N., Kamat, V., Perez, M., Mathee, K., Lerner, B. & Bhansali, S. (2022). New dynamic microreactor system to mimic biofilm formation and test anti-biofilm activity of nanoparticles. Applied Microbiology of Biotechnology, 106 (7): 2729-2738. doi: 10.1007/s00253-022-11855-9.
- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P. & Caro, N. (2021). Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. International Journal of Molecular Sciences, 22 (13): 7202-7223. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
- Bustos, M. J., Drago, S. E., Moles y Cervantes L, Ramírez I.R. & Rojas S. N. (2006). Métodos básicos para el aislamiento e identificación de enterobacterias del agua. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Camargo, A.C., de Paula, O.A.L., Todorov, S.D. & Nero, L.A. (2016). In Vitro Evaluation of Bacteriocins Activity Against *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 178 (6): 1239-1251. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1941-3>
- CANILEC. (2021). Estadísticas del Sector Lácteo 2021-2020. Consultado en: <https://www.canilec.org.mx/wp-content/uploads/2021/04/Compendio-del-Sector-Lacteo-2021.pdf>
- Cantor, A.L. & Cadena, B.P. (2019). Evaluación del efecto de nanopartículas de plata durante el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* en el modelo animal *Galleria*

mellonella. Colombia: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca- Facultad de Ciencias de la Salud. Trabajo de grado. p. 66.

- Cartwright, E.J., Jackson, K.A., Johnson, S.D., Graves, M., Silk, B.J. & Mahon, B.E. (2013). Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (1): 1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1901.120393>
- Castañeda, G., Eslava, C., Castro, N., León, J. & Chaidez, C. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Publica de México*, 56 (6): 654-659. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10632793011>
- Cervantes, B.R.H. (2017). Evaluación de la capacidad de formación de biofilms de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* sobre acero inoxidable mediante microscopía de Epifluorescencia directa. Perú: Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial. p. 108.
- Chamorro, F.H., Cruz, I.A., Gonzáles, J.F. & Nogales, R.L. (2014). Evaluación de la aplicación de BPM y POES, en la implementación del sistema HACCP de un establecimiento procesador de carne de cerdo. *Investigaciones en Inocuidad de Alimentos*. ISBN 978-607-8336-36-4. 352-355.
- Chaudhari, V.P., Rajput, K., Mondal Roy, S., Chaudhuri, T.K. & Roy, D.R. (2022). Experimental and first-principles investigation on the structural, electronic and antimicrobial properties of nickel hydroxide nanoparticles. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 160 (110367): 1-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpics.2021.110367>
- Chauhan, N., Tyagi, A. K., Kumar, P. & Malik, A. (2016). Antibacterial Potential of *Jatropha curcas* Synthesized Silver Nanoparticles against Food Borne Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1748): 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01748>
- Chauhan, V., Dhiman, V.K., Mahajan, G., Pandey, A. & Kanwar, S.S. (2023). Synthesis and characterization of silver nanoparticles developed using a novel lipopeptide(s) biosurfactant and evaluating its antimicrobial and cytotoxic efficacy. *Process Biochemistry*, 124: 51-62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.11.002>

- CLSI. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That grow Aerobically Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 32 (2): 1-70.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S. & Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens*, 6 (3): 41-50. <https://doi.org/10.3390/pathogens6030041>
- Colagiorgi, A., Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S. & Ianieri, A. (2016). A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms*, 4 (3): 22-34. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030022>
- COMECARNE. (2022). Compendio Estadístico 2022. Consultado en: https://comecarne.org/wp-content/uploads/2022/05/compendio_estadistico_2022.pdf
- Corps Ricardo, A.I., Avendaño García, S., Guzmán Bernardo, F.J., Ríos, Á. & Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C. (2021). Rapid assessment of silver nanoparticle migration from food containers into food simulants using a qualitative method. *Food Chemistry*, 361 (130091): 1-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130091>
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C. & Alvarez, A. (2016). New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1641): 1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01641>
- Crisan, C.M., Mocan, T., Manolea, M., Lasca, L.I., Tăbăran, F.A. & Mocan, L. (2021). Review on Silver Nanoparticles as a Novel Class of Antibacterial Solutions. *Applied Sciences*, 11 (3): 1120-1138. <https://doi.org/10.3390/app11031120>
- Da Silva, M.P., Fernandes, P.É., Pimentel-Filho, N.J., Andrade, N. J., Alves, R. B. T., Eller, M. R. & Peña, W.E.L. (2022). Modelling adhesion and biofilm formation by *Bacillus cereus* isolated from dairy products as a function of pH, temperature and time. *International Dairy Journal*, 134 (105472). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105472>
- Di Ciccio, P., Rubiola, S., Panebianco, F., Lomonaco, S., Allard, M., Bianchi, D.M., Civera, T. & Chiesa, F. (2022). Biofilm formation and genomic features of *Listeria monocytogenes* strains isolated from meat and dairy industries located in Piedmont

(Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 378 (109784): 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109784>

- dos Santos, J.S., Biduski, B. & dos Santos, L.R. (2021). *Listeria monocytogenes*: health risk and a challenge for food processing establishments. *Archives of Microbiology*, 203 (10): 5907-5919. doi: 10.1007/s00203-021-02590-2.
- Escobar V.F. (2015). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM). Ecuador: Pontificia Universidad Católica Del Ecuador. Tesis de licenciatura. p. 108.
- Etter, A. J., Hammons, S. R., Roof, S., Simmons, C., Wu, T., Cook, P. W. & Oliver, H. F. (2017). Enhanced Sanitation Standard Operating Procedures Have Limited Impact on *Listeria monocytogenes* Prevalence in Retail Delis. *Journal of Food Protection*, 80 (11): 1903-1912. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-112.
- Fan, Y., Qiao, J., Lu, Z., Fen, Z., Tao, Y., Lv, F. & Bie, X. (2020). Influence of Different Factors on Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* and the Regulation of cheY Gene. *Food Research International*, 137 (109405): 1-36. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109405.
- FAO. (2023). Producción lechera. Consultado en: <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/es/#:~:text=En%20los%20tres%20%C3%BAltimos%20decenios,millones%20de%20toneladas%20en%202018.>
- Fentie, M., Chouhan, G., Moges, M. & Tyagi, P. (2022). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Bryophyllum pinnatum* leaf extract and its antibacterial potential against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Health Sciences*, 6 (2): 5349-5367. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS2.6345>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. & Stasiewicz, M.J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77(1): 150-170. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Figueroa-López, A.M., Maldonado-Mendoza, I.E., López-Cervantes, J., Verdugo-Fuentes, A.A., Ruiz-Vega, D.A. & Cantú-Soto, E.U. (2019). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from pork meat and on inert

surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50 (3): 817-824. doi: 10.1007/s42770-019-00073-7.

- Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A.G., Ripolles-Avila, C. & Rodríguez-Jerez, J.J. (2020). Antimicrobial Activity and Prevention of Bacterial Biofilm Formation of Silver and Zinc Oxide Nanoparticle-Containing Polyester Surfaces at Various Concentrations for Use. *Foods*, 9 (4): 442-457. <https://doi.org/10.3390/foods9040442>
- Forauer, E., Wu, S. T. & Etter, A. J. (2020). *Listeria monocytogenes* in the retail deli environment: A review. *Food Control*, 119 (107443): 1-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107443>
- Fysun, O., Kern, H., Wilke, B. & Langowski, H.C. (2019). Evaluation of factors influencing dairy biofilm formation in filling hoses of food-processing equipment. *Food and Bioproducts Processing*, 113: 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.10.009>
- Galindo, M. (2021). Aplicación de técnicas de detección, confirmación y caracterización para el control de *Listeria monocytogenes* presente en industrias lácteas. España: Universidad de Valladolid, Escuela Superior de Ingenierías Agrarias. Tesis para optar el título Máster en Ingeniería Agronómica. p. 54.
- Gilmartin, N., Guiao, M.S., Keevil, C.W. & O'Keenedy, R. (2016). Differential internalin A levels in biofilms of *Listeria monocytogenes* grown on different surfaces and nutrient conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 219 (2016): 50-55. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.004.
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S. & Briandet, R. (2014). Exploring the Diversity of *Listeria monocytogenes* Biofilm Architecture by High-Throughput Confocal Laser Scanning Microscopy and the Predominance of the Honeycomb-Like Morphotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5): 1813-1819. doi:10.1128/AEM.03173-14
- Ritchie, H., Rosado, P. & Roser, M. (2017). Meat and Dairy Production. Published online at OurWorldInData.org. <https://ourworldindata.org/meat-production>
- Hascoët, A.S. (2019). Desarrollo de biofilms de *Listeria monocytogenes* y microbiota acompañante en instalaciones cárnicas: cuantificación, acción sinérgica y antagonista. España: Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis doctoral. p. 210.

- Idland, L., Granquist, E. G., Aspholm, M. & Lindbäck, T. (2022). The prevalence of *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Norwegian dairy cattle farms: A comparison between free stall and tie stall housing systems. *Journal of Applied Microbiology*, 132 (5): 3959-3972. <https://doi.org/10.1111/jam.15512>
- Alav, I., Sutton, J.M. & Rahman, K.M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73 (8): 2003-2020. doi: 10.1093/jac/dky042. PMID: 29506149.
- Lee, S.H.I., Barancelli, G.V., de Camargo, T.M., Corassin, C.H., Rosim, R.E., da Cruz, A.G. & de Oliveira, C.A.F. (2017). Biofilm-producing ability of 17 *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. *Food Research International*, 91 (2017): 88-91. doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.039
- Istiqola, A. & Syafiuddin, A. (2020). A review of silver nanoparticles in food packaging technologies: Regulation, methods, properties, migration, and future challenges. *Journal Of The Chinese chemical society*, 67 (11): 1942-1956. <https://doi.org/10.1002/jccs.202000179>
- Janez, N., Skrlj, B., Sternisa, M., Klančnik, A. & Sabotic, J. (2021). The role of the *Listeria monocytogenes* surfactome in biofilm formation. *Microbial Biotechnology*, 14 (4):1269-1281. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13847>
- Jaramillo-Bedoya, E., Trujillo-Alzate, Y.A. & Ocampo-Ibáñez, I.D. (2021). Surveillance of Fresh Artisanal Cheeses Revealed High Levels of *Listeria monocytogenes* Contamination in the Department of Quindío, Colombia. *Pathogens*, 10 (10): 1341-1351. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101341>
- Jiang, L. (2011). Comparison of disk diffusion, agar dilution, and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing of five chitosans. Louisiana: thesis to obtain the degree of master of science. p. 727.
- Jiménez-Edeza, M., Castillo-Burgos, M., Germán-Báez, L.J. & Castañeda-Ruelas, G.M. (2020). Venta a granel de embutidos: una tendencia de comercialización asociada al riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos en Culiacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11 (3): 848-858. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i3.5274>.

- Joshi, A.S., Singh, P.& Mijakovic, I. (2020). Interactions of Gold and Silver Nanoparticles with Bacterial Biofilms: Molecular Interactions behind Inhibition and Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (20): 7658-7682. doi:10.3390/ijms21207658
- Juárez-Maldonado, A., Rosales-Velázquez, J.L., Ortega-Ortiz, H., Cabrera-De la Fuente, M., Ramírez, H. & Benavides-Mendoza, A. (2013). Acumulación de nanopartículas de plata y su efecto en la capacidad antioxidante en *Allium cepa* L. *YTON Revista Internacional de Botánica Experimental*, 82 (1): 91-97. <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572013000100013&lng=es&nrm=iso>
- Kannan, S., Balakrishnan, J. & Govindasamy, A. (2020). *Listeria monocytogenes* - Amended understanding of its pathogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasión. *Microbial Pathogenesis*, 149 (104575): 1-9. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104575.
- Kaptchouang Tchatchouang, C.-D.; Fri, J.; Montso, P.K.; Amagliani, G.; Schiavano, G.F.; Manganyi, M.C.; Baldelli, G.; Brandi, G. & Ateba, C.N. (2022). Evidence of Virulent Multi-Drug Resistant and Biofilm-Forming *Listeria* Species Isolated from Various Sources in South Africa. *Pathogens*, 11 (8): 843-861. <https://doi.org/10.3390/pathogens11080843>
- Keeney, K., Trmcic, A., Zhu, Z., Delaquis, P. & Wang, S. (2018). Stress Survival Islet 1 Contributes to Serotype-specific Differences in Biofilm Formation in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 67 (6): 530-536. <https://doi.org/10.1111/lam.13072>
- Kim, D.Y., Sung, J.S., Kim, M. & Ghodake, G. (2015). Rapid production of silver nanoparticles at large-scale using gallic acid and their antibacterial assessment. *Material Letters*, 155: 62-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.04.138>
- Kocot, A.M. & Olszewska, M.A. (2017). Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *LWT- Food Science and Technology*, 84: 47-57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.042>

- Kramer, B., Mignard, C., Warschat, D., Gürbüz, S., Aiglstorfer, P. & Muranyi, P. (2021). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on bologna by a beta acid rich hop extract. *Food Control*, 126 (108040): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108040>
- Lakicevic, B., Jankovic, V., Pietzka, A. & Ruppitsch, W. (2023). Wholegenome sequencing as the gold standard approach for control of *Listeria monocytogenes* in the food chain. *Journal Of Food Production*, 86 (100003): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.10.002>
- Lazić, V., Vivod, V., Peršin, Z., Stoiljković, M., Ratnayake, I.S., Ahrenkiel, P.S. & Kokol, V. (2020). Dextran-coated silver nanoparticles for improved barrier and controlled antimicrobial properties of nanocellulose films used in food packaging. *Food packaging and Shelf life*, 26 (100575): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100575>
- Lee, B.H., Cole, S., Berchoux, S.B., Guillier, L., Felix, B., Krezdorn, N., Hébraud, M., Bernardi, T., Sultan, I. & Piveteau, P. (2019). Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* Strains Under Food Processing Environments and Pan-Genome-Wide Association Study. *Frontiers in Microbiology*, 10 (2698): 1-18. doi: 10.3389/fmicb.2019.02698
- Liu Y., Wu L., Han J., Dong P., Luo X., Zhang Y. & Zhu L. (2021). Inhibition of Biofilm Formation and Related Gene Expression of *Listeria monocytogenes* in Response to Four Natural Antimicrobial Compounds and Sodium Hypochlorite. *Frontiers in Microbiology*, 11 (617473): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.617473>
- Macleod, J., Beeton, M. L. & Blaxland, J. (2022). An Exploration of *Listeria monocytogenes*, Its Influence on the UK Food Industry and Future Public Health Strategies. *Foods*, 11(10): 1456-1474. doi: 10.3390/foods11101456.
- Mahoney, D. B. J., Falardeau, J., Hingston, P., Chmielowska, C., Carroll, L. M., Wiedmann, M. & Wang, S. (2022). Associations between *Listeria monocytogenes* genomic characteristics and adhesion to polystyrene at 8°C. *Food Microbiology*, 102 (103915): 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103915>
- Mares, F. (2015). Síntesis verde de nanopartículas de Ag y su evaluación antibacterial en *Escherichia coli*. Morelia: Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo. Tesis para obtener el grado de Maestría en Metalurgia y Ciencias de los Materiales. p.87.

- Marinescu, L., Fikai, D., Fikai, A., Oprea, O., Nicoara, A.I., Vasile, B.S., Boanta, L., Marin, A., Andronescu, E. & Holban, A.M. (2022). Comparative Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Obtained by Wet Chemical Reduction and Solvothermal Methods. *International Journal of Molecular Science*, 23 (11): 5982-6006. doi: 10.3390/ijms23115982.
- Markowska, K., Grudniak, A. M., Milczarek, B. & Wolska, K. I. (2018). The Effect of Silver Nanoparticles on *Listeria monocytogenes* PCM2191 Peptidoglycan Metabolism and Cell Permeability. *Polish Journal of Microbiology*, 67 (3): 315-320. doi: 10.21307/pjm-2018-037.
- Martínez, L.D. (2020). Principales bacterias transmitidas por alimentos, preservación y control. *Agrobiología. Una visión general y sus aplicaciones* Luis G. Ramírez Mérida. ISBN 978-65-991393-0-7 (Ed.). 4: 56-77. <https://doi.org/10.4322/mp.2020.001.04>
- Matereke, L.T., Okoh A. (2020). *Listeria monocytogenes* Virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: a review. *Pathogens*, 9 (7): 528-540. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070528>
- Mathew, S., Snigdha, S., Mathew, J. & Radhakrishnan, E. K. (2019). Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages. *Food Packaging and Shelf Life*, 19: 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.009>Get rights and content
- Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, B.R.H., Turitich, L., Ripolles-Avila, C. & Rodríguez-Jerez, J.J. (2022). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces through conventional and alternative cleaning solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 381 (109888): 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109888>
- Mazaheri, T.; Cervantes-Huamán, B.R.H.; Bermúdez-Capdevila, M.; Ripolles-Avila, C. & Rodríguez-Jerez, J.J. (2021). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen. *Microorganisms*, 9 (1): 181-200. doi: 10.3390/microorganisms9010181.
- Moreto, T. & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1 (2): 107-121. Doi: 10.1017/S1479050504001322.

- Mpundu, P., Muma, J.B., Mukumbuta, N., Mukubesa, A.N., Muleya, W., Kapila, P., Hang'ombe, B.M. & Munyeme, M. (2022). Isolation, discrimination, and molecular detection of *Listeria* species from slaughtered cattle in Namwala District, Zambia. *BMC Microbiology*, 22 (1): 160-172. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02570-6>
- Muthulakshmi, L., Suganya, K., Murugan, M., Annaraj, J., Duraipandiyar, V., Al Farraj, D. A., Elshikh, M.S., Juliet, A., Pasupuleti, M. & Arockiaraj, J. (2022). Antibiofilm efficacy of novel biogenic silver nanoparticles from *Terminalia catappa* against food-borne *Listeria monocytogenes* ATCC 15,313 and mechanisms investigation in-vivo and in-vitro. *Journal of King Saud University–Science*, 34(5): 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102083>
- Naganthran, A., Verasoundarapandian, G., Khalid, F. E., Masarudin, M. J., Zulkharnain, A., Nawawi, N. M., Karim, M., Che Abdullah, C. A. & Ahmad, S. A. (2022). Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(2): 427-470. <https://doi.org/10.3390/ma15020427>
- Neha, N., Anand, S., Djira, G., Kraus, B. & Sutariya, S. (2018). *Listeria* cross contamination levels in raw ice cream mix can serve as a predictor of their potential presence as heat-injured cells. *Journal Dairy Science*, 101(11):9659-9669. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14486>
- Nilsson, R.E., Ross, T.& Bowman, J.P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150 (1) 14–24. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.012
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5650705&fecha=02/05/2022#gsc.tab=0
- Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4901269&fecha=19/11/1997
- Nowak, J., Visnovsky, S.B., Pitman, A.R., Cruz, C., Palmer, J., Fletcher, G.C. & Flint, S. (2021). Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* 15G01, a Persistent Isolate from a Seafood-Processing Plant, Is Influenced by Inactivation of Multiple Genes

Belonging to Different Functional Groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 87 (10): 1-19. doi: 10.1128/AEM.02349-20

- OECD/FAO. (2022). OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/f1b0b29c-en>.
- Olanbiwoninu, A.A. & Popoola, B.M. (2023). Biofilms and their impact on the food industry- Review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30 (103523): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103523>
- Osek, J., Lachtara, B. & Wieczorek, K. (2022). *Listeria monocytogenes*- How This Pathogen Survives in Food-Production Environments?. *Frontiers in microbiology*, 13 (866462): 1441-1462. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866462>
- Pandey, P., Deshpande, P., Shirolkar, M. M., Patil, Y., Tiwari, A. K. & Kulkarni, A. (2021). Augmented *Listeria monocytogenes* Biofilm Architecture Disruption and Synergistic effect of Antibiotics on Bacterial Species by Biosynthesized Silver Nanoparticles. *ChemistrySelect*, 6 (8): 1782-1786. <https://doi.org/10.1002/slct.202004687>
- Park, M., Kim, J., Horn, L., Haan, J., Strickland, A., Lappi, V., Boxrud, D., Hedberg, C., Ryu, S., y Jeon, B. (2022). Sugar Modification of Wall Teichoic Acids Determines Serotype-Dependent Strong Biofilm Production in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology spectrum*, 10 (5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02769-22>
- Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Consultado el 20 de agosto de 2022. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1109p.pdf>
- Ramires, T., Rauber Kleinubing, N., Almeida Iglesias, M., Reissig Soares Vitola, H., Souto Pereira Nuncio, A., Schneid Kroning, I. & Padilha da Silva, W. (2020). Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. *Food Research International*, 140 (109871): 1-8. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109871.
- Reis-Teixeira, F.B.D, Alves, V.F. & de Martinis, E.C.P. (2017). Growth, viability, and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces.

Brazilian Journal of Microbiology, 48(3): 587-591.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004>

- Ribeiro, A.C., Almeida, F.A.D., Medeiros, M.M., Miranda, B.R., Pinto, U.M. & Alves, V.F. (2023). *Listeria monocytogenes*: An Inconvenient Hurdle for the Dairy Industry. Dairy, 4 (2:) 316-344. <https://doi.org/10.3390/dairy4020022>
- Ripollés, C. (2018). Supervivencia de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de contacto con alimentos: un abordaje multidisciplinar de un problema complejo. España: Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos. p. 252.
- Ripolles-Avila, C., Guitan-Santamaria, M., Pizarro-Giménez, K., Mazaheri, T. & Rodríguez-Jerez, J.J. (2022). Dual-species biofilms formation between dominant microbiota isolated from a meat processing industry with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*: Unraveling their ecological interactions. Food Microbiology, 105 (104026): 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104026>
- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Guerrero-Navarro, A.E. & Rodríguez-Jerez, J.J. (2018). Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. Food Control, 92: 240-248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.054>
- Rodríguez, J. P. (2018). Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes* Revista Chilena de Infectología, 35 (6): 649-657. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182018000600649>.
- Rodríguez, C., Taminiau, B., García-Fuentes, E., Daube, G. & Korsak, N. (2021). *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. Food Control. Vol. 120 (107540): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107540>
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J.J., Vázquez-Sánchez, D. & López-Cabo, M. (2018). Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. Foods, 7 (6): 85-104. doi: 10.3390/foods7060085
- Romero, N. (2017). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo en mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México. Tesis para obtener el título

de Médico Veterinario Zootecnista. México: Universidad Autónoma del Estado de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. p.59.

- Ronquillo-de Jesús, E., Aguilar-Méndez, M. A., López-Perea P., Guzmán-Mendoza, J., Hernández-Martínez, V., Quiroz-Reyes, N., Cruz-Hernández, M. A. & Ortiz-Balderas, M. (2018). Síntesis de nanopartículas de plata utilizando extractos acuosos de tejocote como agente reductor y pasivante. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 10(2): 67–75. doi: 10.5154/r.inagbi.2017.12.018
- Salazar, J.K., Stewart, D., Shazer, A. & Tortorello, M.L. (2020). Long-term– 20°C survival of *Listeria monocytogenes* in artificially and process-contaminated ice cream involved in an outbreak of listeriosis. *Journal of Dairy Science*, 103(1):172-175. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16774>
- Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N. & Fauzi, M. B. (2020). The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action. *Nanomaterials*, 10(8):1556-1576. doi: 10.3390/nano10081566.
- Sanchooli, N., Saeidi, S., Barani, H. K. & Sanchooli, E. (2018). *In vitro* antibacterial effects of silver nanoparticles synthesized using *Verbena officinalis* leaf extract on *Yersinia ruckeri*, *Vibrio cholera* and *Listeria monocytogenes*. *Iranian Journal of Microbiology*, 10(6): 400–408. PMID: PMC6414745.
- Schoder, D., Pelz, A. & Paulsen, P. (2023). Transmission Scenarios of *Listeria monocytogenes* on Small Ruminant On-Farm Dairies. *Foods*, 12 (2): 265-286. <https://doi.org/10.3390/foods12020265>
- Sharma, V., Aseri, G.K., Bhagwat, P.K., Jain, N. & Ranveer, R.C. (2022). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Acinetobacter movanagherensis* AS isolated from goat rectum. *Food Frontiers*, 3(1): 172-181. <https://doi.org/10.1002/fft2.116>
- Shourav, A. H., Hasan, M. & Ahmed, S. (2020). Antibiotic susceptibility pattern of *Listeria* spp. isolated from cattle farm environment in Bangladesh. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2 (100082): 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100082>

- Siddique, M. H., Aslam, B., Imran, M., Ashraf, A., Nadeem, H., Hayat, S., Khurshid, M., Afzal, M., Malik, I., Shahzad, M., Qureshi, U., Khan, Z.U.H. & Muzammil, S. (2020). Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed Research International*, 2020 (6398165): 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/6398165>
- Sileikaite, A., Puiso, J., Prosycevas, I. & Tamulevicius, S. (2009). Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. *Materials Science (Medžiagotyra)*, 15 (1): 21-27. ISSN 1392–1320. <https://epubl.ktu.edu/object/elaba:2971910/>
- Skjerdal, T., Gangsei, L.E., Alvseike, O., Kausrud, K., De Cesare, A., Alexa, E. & Aauge, S.J. (2021). Development and validation of a regression model for *Listeria monocytogenes* growth in roast beefs. *Food Microbiology*, 98 (103770): 1-10. doi: 10.1016/j.fm.2021.103770.
- Sobczak-Kupiec, A., Malina, D., Wzorek, Z. & Zimowska, M. (2011). Influence of silver nitrate concentration on the properties of silver nanoparticles. *Micro & Nano Letters-The Institution of Engineering and Technology*, 6 (8): 656-660. doi: 10.1049/mnl.2011.0152
- Soosai, D.M. (2016). Identification of Genetic Determinants Associated with Biofilm Formation Capacity of *Listeria Monocytogenes*. Canadá: Universidad de Otawa. Tesis para optar el título de Máster en Ciencias en Microbiología e Inmunología. p.130.
- Summer, M., Tahir, H.M., Ali, T., Abaidullah, R., Mumtaz, S. & Nawaz, S. (2023). Bactericidal potential of different size sericin-capped silver nanoparticles synthesized by heat, light, and sonication. *Journal Of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200632>. Epub ahead of print. PMID: 36879387.
- Sumrall, E. T., Keller, A. P., Shen, Y. & Loessner, M. J. (2020). Structure and function of *Listeria* teichoic acids and their implications. *Molecular Microbiology*, 113 (3): 627-637. doi: 10.1111/mmi.14472.
- Thakali, A. & MacRae, J. D. (2021). A review of chemical and microbial contamination in food: What are the threats to a circular food system?. *Environmental Research*, 194 (110635): 1-16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110635>

- Thomassen, G. M. B., Krych, L., Knøchel, S. & Mehli, L. (2023). Bacterial community development and diversity during the first year of production in a new salmon processing plant. *Food Microbiology*, 109 (104138): 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104138>
- Tiong, H.K. & Muriana, P.M. (2016). RT-qPCR Analysis of 15 Genes Encoding Putative Surface Proteins Involved in Adherence of *Listeria monocytogenes*. *Pathogens*, 5 (4): 60-79. doi: 10.3390/pathogens5040060
- Titouche, Y., Akkou, M., Houali, K., Auvray, F. & Hennekinne, J. A. (2022). Role of milk and milk products in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the dairy production chain. *Journal of Food Science*, 87 (9). 3699-3723. doi: 10.1111/1750-3841.16259
- Toliopoulos, C. & Giaouris, E. (2023). Marked inter-strain heterogeneity in the differential expression of some key stress response and virulence-related genes between planktonic and biofilm cells in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 390 (110136): 1-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110136>
- Trejo, T. (2017). Análisis multivariante que determina los factores de consumo de helado artesanal en la Ciudad de México. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias de Administración de Negocios. México: Instituto Politécnico Nacional: Escuela Superior de Comercio y Administración Unidad Tepepan. p.148.
- Valderrama, W.B. & Cutter, C.N. (2013). An Ecological Perspective of *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8): 801-817. doi: 10.1080/10408398.2011.561378.
- Valecha, M. & Posada, D. (2022). Somatic variant calling from single-cell DNA sequencing data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20: 2978–2985. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.06.013>
- Vidovic, S., Paturi, G., Gupta, S. & Fletcher, G.C. (2022). Lifestyle of *Listeria monocytogenes* and food safety: Emerging listericidal technologies in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1-19. DOI 10.1080/10408398.2022.2119205.

- Vilchis-Rangel, R.E., Espinoza-Mellado, M., Salinas-Jaramillo, I.J., Martínez-Peña, M.D. & Rodas-Suárez, O.R. (2019). Association of *Listeria monocytogenes* LIPI-1 and LIPI-3 marker *lIsX* with invasiveness. *Current Microbiology*, 76 (5): 637–643. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01671-2>
- Vishwakarma, V. (2019). Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. *Journal of Basic Microbiology*, 60 (3): 198-206. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900569>
- Wang, H. & Jiang, X. (2022). Isolation and characterization of competitive exclusion microorganisms from animal wastes– based composts against *Listeria monocytogenes*. *Journal Applied Microbiology*, 132 (6): 4531-4543. <https://doi.org/10.1111/jam.15528>
- Wang, Y., Sun, L., Hu, L., Wang, Z., Wang, X. & Dong, Q. (2022). Adhesion and kinetics of biofilm formation and related gene expression of *Listeria monocytogenes* in response to nutritional stress. *Food Research International*, 156 (111143): 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111143>
- Warke, S. R., Ingle, V. C., Kurkure, N. V., Tembhurne, P. A., Prasad, M., Chaudhari, S.P. & Barbuddhe, S. B. (2017). Biofilm Formation and Associated Genes in *Listeria Monocytogenes*. *The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*, 12 (3): 7-12. <http://dx.doi.org/10.21887/ijvsbt.v12i3.7079>
- Winkelströter, L.K., Reis-Teixeira, F., Lameu, G. & Pereira, E.C. (2016). Chapter 22.3 Understanding *Listeria monocytogenes* biofilms: perspectives into mechanisms of adaptation and regulation under stress conditions. *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, First Edition: 1274-1278. <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch123>
- Xu, L., Wang, Y.Y., Huang, J., Chen, C.Y., Wang, Z.X. & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 10 (20): 8996-9031. <https://doi.org/10.7150/thno.45413>
- Yan, L., Pei, X., Miao, J., Li, Y., Yang, S., Peng, Z., Yang, X., Mei, L., Yang, Q., Ren, H., Yang, D. & Shi, H. (2022). Surveillance and examination of microbial contamination in ice cream in China. *Food quality and safety*, 6: 1-8. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyac047 A>

- Yao, S., Hao, L., Zhou, R., Jin, Y., Huang, J. & Wu, C. (2022). Multispecies biofilms in fermentation: Biofilm formation, microbial interactions, and communication. *Comprehensive Reviews in Food Sciences and Food Safety*, 21 (4): 3346-75. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12991>
- Yaseen, B., Gangwar, C., Nayak, R., Kumar, S., Sarkar, J., Banerjee, M. & Naik, R. M. (2023). Gabapentin loaded silver nanoparticles (GBP@AgNPs) for its promising biomedical application as a nanodrug: Anticancer and Antimicrobial activities. *Inorganic Chemistry Communications*, 149: 110380. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.110380>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L. & He, J. (2019). Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20 (14): 3423-3441. <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
- Zakrzewski, A.J., Kurpas, M., Zadernowska, A., Chaj ecka-Wierzchowska, W. & Fraqueza, M.J. (2023). A Comprehensive Virulence and Resistance Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolated from Fish and the Fish Industry Environment. *International Journal Molecular Sciences*, 24 (4): 3581-3596. <https://doi.org/10.3390/ijms24043581>
- Zhang, H., Wang, J., Chang, Z., Liu, X., Chen, W., Yu, Y., Wang, X., Dong, Q., Ye, Y. & Zhang, X. (2021). *Listeria monocytogenes* Contamination Characteristics in Two Ready-to-Eat Meat Plants From 2019 to 2020 in Shanghai. *Frontier in Microbiology*, 12 (729114): 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.729114>
- Zhang, X., Wang, S., Chen, X. & Qu, C. (2021). Review controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products: An overview of outbreaks, current legislations, challenges, and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 116 (2021): 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.014>