

# Cambios en aislamientos de *Listeria innocua* conservados en un medio bifásico durante ocho meses

Changes in *Listeria innocua* isolates preserved in a biphasic medium for eight months

Luis Raúl Díaz-Cárdenas  
Beatriz Teresa Rosas-Barbosa\*

Departamento de Salud Pública.  
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara.  
Jalisco, México.

\*Autor para correspondencia: beatriz.rosas@academicos.udg.mx

## Resumen

*Listeria innocua* es una bacteria filogenéticamente relacionada con *Listeria monocytogenes*, agente causal de la listeriosis transmitida por alimentos. Los estudios publicados respecto a la sobrevivencia a largo plazo de *L. innocua* han sido realizados en períodos cortos y observación de células individuales a partir de medios líquidos, pero no se han publicado estudios a partir de medios bifásicos con énfasis en las colonias. El objetivo de este trabajo fue describir la sobrevivencia, durante 8 meses de 30 aislamientos de *Listeria innocua* en un medio bifásico compuesto en su parte líquida por Caldo Infusión Cerebro Corazón adicionado de Extracto de Levadura (0.6 %) y en su parte sólida por Agar Soya Trypticaseína adicionado de Extracto de Levadura (0.6 %). Mensualmente se realizaron observaciones a simple vista y registro fotográfico, enfocando las observaciones a la presencia de colonias en el área anterior del bisel. Mediante estadística descriptiva se identificaron los cambios en la frecuencia y tipo de colonias, así como en los tiempos de generación.

Todos los aislamientos presentaron al menos un tipo de cambio, consistente en surgimiento, aumento, disminución y desaparición de colonias con diferentes morfologías, o bien, en un incremento en la densidad de biomasa de algunas colonias. Los cambios pudieran atribuirse a factores como pH, temperatura, limitación de nutrientes, quorum sensing y genéticos. Los procedimientos y resultados descritos en este trabajo pueden servir de modelo educativo para: mostrar persistencia bacteriana a largo plazo, investigación de diversidad genética, sobrevivencia en estarvación y estudios de persistencia de cepas relacionadas con resistencia a antimicrobianos o desinfectantes.

**Palabras clave:** Listeriosis, sobrevivencia bacteriana a largo plazo, estarvación.

## Abstract

*Listeria innocua* is a bacterium phylogenetically related to *Listeria monocytogenes*, the causative agent of foodborne listeriosis. Published studies regarding the long-term survival of *L. innocua* have been performed on short periods and single cell observation from liquid media, but studies in biphasic media with an emphasis on colonies have not been published. The objective of this work was to describe the survival, during 8 months, of 30 *Listeria innocua* isolates in a biphasic medium composed in its liquid part by Brain Heart Infusion Broth added with 0.6 % Yeast Extract and in its solid part by Trypticasein Soy Agar added with 0.6 % Yeast Extract. Observations with the naked eye and photographic record were made monthly, focusing the observations on the presence of colonies in the slant front side area. Through descriptive statistics, the changes in the frequency and type of colonies, as well as in the generation time were identified.

All the isolates showed at least one type of change, consisting of the emergence, increase, decrease and disappearance of colonies with different morphologies, or an increase in the biomass density of some colonies. Changes can be attributed to factors such as pH, temperature, nutrient limitation, quorum sensing and genetics. The procedures and results described in this work can serve as an educational model for showing bacterial long term persistence, research on genetic diversity, survival in starvation and persistence studies of strains related to resistance to antimicrobials or disinfectants.

**Keywords:** Listeriosis, long-term bacterial survival, starvation.

## Introducción

*Listeria innocua* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, no esporulada que fue descrita por primera vez en 1977 (Seeliger, 1981), encontrándose en el suelo, vegetación, lodo, aguas de drenaje, excremento de animales y personas, (McLaughlin, y Rees, 2009; Sauders y Wiedmann, 2007). Su genoma, publicado en 2003, muestra que está estrechamente relacionada con *Listeria monocytogenes*, agente causal de la listeriosis transmitida por alimentos (Datta y Burall, 2018); Glaser et al., 2007). Las condiciones óptimas para el desarrollo de *L. innocua* son temperatura de 37.4 °C y pH de 7.2 pero es factible que pueda crecer a temperaturas extremas de -4.5 °C y 45.4 °C y pH 4.2 a 10.07 (Le Marc et al., 2002). También puede sobrevivir en salmueras que contienen 13.2% de NaCl (Boyer et al., 2009).

*Listeria innocua* está relacionada metabólicamente y filogenéticamente con *L. monocytogenes*, ambas han sido aisladas de muestras similares y pueden persistir simultáneamente en fábricas que elaboran productos lácteos (Kaszoni-Rückerl et al., 2020; Milillo et al. 2012; Orsi y Wiedman 2016). Por lo anterior, *L. innocua* ha sido utilizada como microorganismo sustituto (también llamado subrogado) para evaluar la efectividad de procedimientos o para investigar y controlar *L. monocytogenes* en fábricas de alimentos o en ciertos alimentos como el perejil (Milillo et al. 2012). Sin embargo, los genes expresados y las proteínas producidas, indican que *L. innocua* se adapta al stress y a los nichos ecológicos de forma diferente a como lo hace *L. monocytogenes* (Milillo et al., 2012).

En general se considera que *L. innocua* no es patógena, sin embargo, se han reportado casos de listeriosis ocasionados por esta especie en personas, bovinos y ovinos (Favaro et al., 2014; Fentahun y Fresebehat, 2012; Orsi y Wiedmann, 2016; Perrin et al., 2003; Rocha et al., 2013).

Se ha identificado un grupo atípico de *L. innocua*, conocido como grupo D que constituye un enlace evolutivo con *L. monocytogenes* pues contiene la internalina *inlA*, proteína necesaria para invadir células de mamíferos y presencia de los islotes de patogenicidad LIPI-1 y LIPI-3 relacionados con la capacidad hemolítica (Clayton et al., 2014, Kaszoni-Rückerl et al., 2020 Moura et al., 2019).

Los estudios publicados respecto a la sobrevivencia a largo plazo de *L. innocua* han sido realizados en períodos relativamente cortos y se han enfocado a la identificación de genes y a la observación de células individuales a partir de medios líquidos, pero no se han publicado estudios a partir de medios sólidos con énfasis en colonias. A partir de una búsqueda bibliográfica en las bases de datos Pub Med, Science Direct, Springer Link y Web of Science, durante el período enero 1972 a junio 2022 se detectó poca información acerca de la sobrevivencia a largo plazo de *L. innocua*. Por lo anterior, y considerando la hipótesis de actividad metabólica durante la sobrevivencia a largo plazo (Finkel 2006), el objetivo de este trabajo fue describir la sobrevivencia a largo plazo de esta especie de *Listeria* durante un período de 8 meses en un medio bifásico compuesto en su parte líquida por Caldo Infusión Cerebro Corazón adicionado de Extracto de Levadura y en su parte sólida por Agar Soya Trypticaseína adicionado de Extracto de Levadura.

## Materiales y métodos

Se observaron los primeros 30 aislamientos consecutivos de *L. innocua* que forman parte del cepario obtenido a partir de muestreos en 4 queserías artesanales (A, B, C y D) durante el período 1999-2000 en una comunidad del municipio de Zapotlanejo, Jalisco (Rosas-Barbosa et al., 2014).

Durante el período 2000 a 2017 los aislamientos fueron conservados en tubos de vidrio con medio de cultivo inclinado compuesto de Agar Soya Trypticaseína adicionado de 0.6 % de Extracto de Levadura (ASTEL). En abril de 2017 los tubos se abrieron para colocar nuevos nutrientes consistentes en 4 a 7 mL de Caldo Infusión Cerebro Corazón adicionado de 0.6 % de Extracto de Levadura. Los tubos permanecieron almacenados en gavetas sin exposición a la luz, a temperatura ambiente en el Laboratorio de Microbiología Alimentaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) ubicado en La Venta del Astillero, Zapopan, Jalisco, México.

Con la finalidad de verificar viabilidad de los cultivos, en mayo de 2017 los tubos se abrieron pa-

ra tomar una asada de caldo que fue sembrada en cajas con ASTEL las cuales fueron incubadas a 35 °C, a partir de ellas se observó la morfología colonial mediante transiluminación oblicua, conocida también como iluminación de Henry (Hitchins, *et al.*, 2022), se verificó el Gram mediante tinción (Hitchins, *et al.*, 2022) y suspensión con hidróxido de potasio al 3 % (Halebian *et al.*, 1981). Así mismo se hicieron pruebas de catalasa y de movilidad según las técnicas reportadas por Hitchins, *et al.*, 2022. En diciembre de 2018 nuevamente se verificó viabilidad de todos los cultivos mediante el procedimiento arriba descrito, pero además se realizaron pruebas de hemólisis y CAMP, así como prueba de hidrólisis de esculina (Hitchins, *et al.*, 2022). Como controles de las pruebas realizadas se utilizaron *Listeria monocytogenes* CA, *L. monocytogenes* Scott, *L. monocytogenes* V7 y *L. innocua* que fueron proporcionadas por el Dr. Michael Doyle del Food Research Institute (Universidad de Wisconsin, Estados Unidos de Norteamérica). A partir de agosto de 2019 y hasta

marzo de 2020 se realizaron observaciones mensuales a simple vista y registro fotográfico (Gray, 1954), enfocando las observaciones a la presencia de colonias en el área anterior del bisel (Figura 1).

Las condiciones de trabajo fueron las que corresponden a un laboratorio nivel de bioseguridad 2 (Organización Mundial de la Salud 2005).

Para su observación y fotografía, los aislamientos se sostuvieron con pinzas de laboratorio, montadas en un soporte universal mediante una doble nuez, a una distancia de 30 cm del observador. La altura se ajustó para que la parte del bisel quedara a la altura de los ojos del observador.

Las fotografías se tomaron utilizando una cámara digital Samsung WB 110 con sensor de imágenes de 20 megapíxeles. Las observaciones y toma de fotografías se realizaron en el intervalo comprendido entre las 10 de la mañana y las 4 de la tarde, con una combinación de iluminación natural procedente de ventanas laterales situadas a 3.9 metros del área de trabajo y luz artificial procedente de lámparas fluorescentes colocadas en el techo del

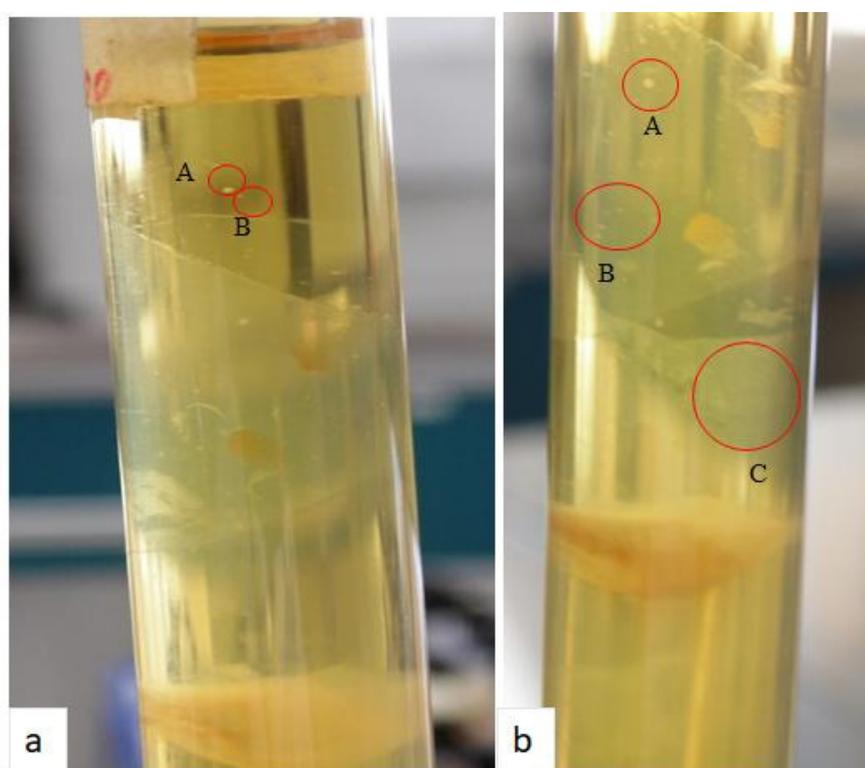


Figura 1. Tipos de colonias y cambios observados en el mes de enero 2020 respecto al mes de agosto 2019. Aislamiento F-912 de *L. innocua* obtenido del refrigerador de la quesería D. Las colonias se clasificaron de acuerdo a su tamaño, como macrocolonias **A**, microcolonias **B** y césped **C**. **a)** Agosto 2019: Ausencia de césped. Coexistencia de macrocolonias y microcolonias. **b)** Enero 2020: Microcolonias formando un semicírculo. Surgimiento de césped. Las “manchas amarillas” son acúmulos de microcolonias cuyos cambios no se investigaron.

laboratorio a 2.30 metros del área de trabajo. A las colonias presentes en el bisel se les midió su diámetro con una regla semirrígida y/o un calibrador plástico con escala Vernier marca Scala® con límite de medición de 0.1 mm. Las colonias se clasificaron de acuerdo al tamaño y cantidad perceptible a simple vista de acuerdo a las siguientes 3 categorías: **a)** Macrocolonias: colonias iguales o mayores a 1 mm de diámetro, **b)** Microcolonias: colonias de 0.2 a 0.9 mm y **c)** Césped: colonias menores a 0.2 mm. Estas categorías se establecieron con base a la experiencia adquirida durante el estudio piloto realizado de 2017 a 2018.

Mediante estadística descriptiva se identificaron los cambios en la frecuencia del número y tipo de colonias presentes en cada uno de los aislamientos estudiados. Para la estimación de la tendencia en el número de colonias durante el período estudiado se calculó mediante regresión lineal empleando el programa Excel 2013.

Para el análisis del cambio en el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de un mes respecto al mes anterior, se utilizó la fórmula de cambio porcentual (Celis de la Rosa, 2008) expresado como:

$$CP = \frac{UFC \text{ mes posterior} - UFC \text{ mes anterior}}{UFC \text{ mes anterior}} (100)$$

Donde:

CP: Cambio porcentual

*UFC mes posterior*: Número de unidades formadoras de colonias en el mes que se compara respecto al mes que le precede (mes anterior).

*UFC mes anterior*: Número de unidades formadoras de colonias en el mes anterior al que se compara.

El cálculo del cambio relativo en logaritmos  $\log_{10}$  se estableció mediante la siguiente fórmula, adaptada de la descrita por Roe *et al.*, (2018):

$$CR = \frac{\log_{10} \text{ mes posterior} - \log_{10} \text{ mes anterior}}{\log_{10} \text{ mes anterior}}$$

Donde:

CR: Cambio relativo en logaritmos

$\log_{10}$  mes posterior: Logaritmo base 10 del número de unidades formadoras de colonias en el mes que se compara respecto al mes que le precede (mes anterior).

$\log_{10}$  mes anterior: Logaritmo base 10 del número

de unidades formadoras de colonias en el mes anterior al que se compara.

El tiempo de generación se basó en las siguientes fórmulas descritas por el Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería para América Latina (ERFCL, 1981)

$$n = \frac{\log b - \log B}{\log 2}$$

$$TG = \frac{Tt}{n}$$

Donde:

*log b*: logaritmo base 10 del número de unidades formadoras de colonias al final del período de observación (mes posterior)

*log B*: logaritmo base 10 del número de unidades formadoras de colonias al inicio del período de observación (mes anterior)

*log 2*: logaritmo base 10 del número 2 puesto que las bacterias se dividen por fisión binaria, dando origen a dos individuos

*n*: número de generaciones ocurridas en un tiempo dado

*Tt*: Tiempo total en 30 días expresado en minutos = 43 200 minutos

*TG*: Tiempo de Generación

Para expresar el tiempo de generación en días, el resultado obtenido se dividió entre 1 440 que son los minutos que tiene un día.

## Resultados

Se identificaron diferentes morfologías coloniales relacionadas con las condiciones de hidratación que presentaba el agar. En 28 aislamientos se observaron una o más de las siguientes morfologías: macrocolonias, microcolonias y césped (Figuras 1 y 2). Dos aislamientos (F-621 y F-1278) mostraron colonias con ramificaciones que presentan extremos blanquecinos, por lo que se les denominó tipo copo de nieve (Figuras 3, 4 y 5).

En una macrocolonia de tipo circular y en 4 de tipo copo de nieve se detectaron cambios en la densidad de su biomasa a través del tiempo (Figuras 2 a 5).

Mediante el cálculo del cambio porcentual, la modificación en el número de colonias observadas de un mes respecto al anterior fue clasificada como cambio. Los cambios consistieron en surgimiento, aumento, disminución o desaparición de colonias (Cuadros 1 y 2).

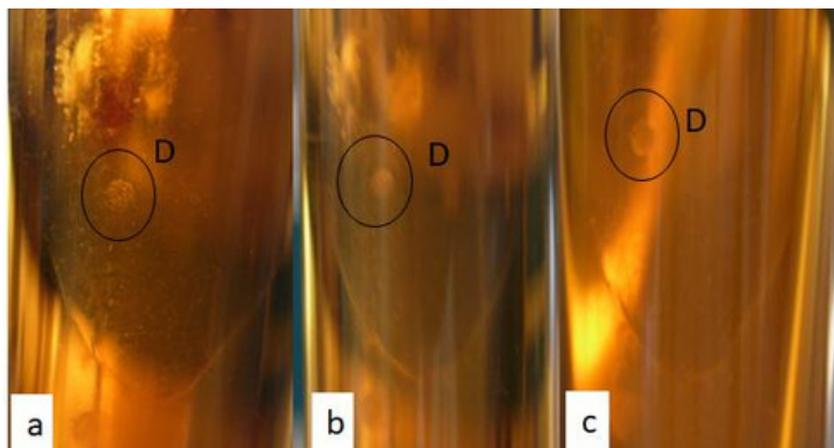


Figura 2. Cambios en macrocolonia del aislamiento F-119 de *L. innocua* en los meses de febrero y marzo 2020 respecto a septiembre 2019. **a)** Septiembre 2019. Macrocolonia con grumos y espacios en su interior y borde inferior izquierdo. **b)** Febrero 2020. Aumento en la densidad de la biomasa de la macrocolonia. **c)** Marzo 2020. Macrocolonia con mayor densidad en su interior y su borde inferior izquierdo

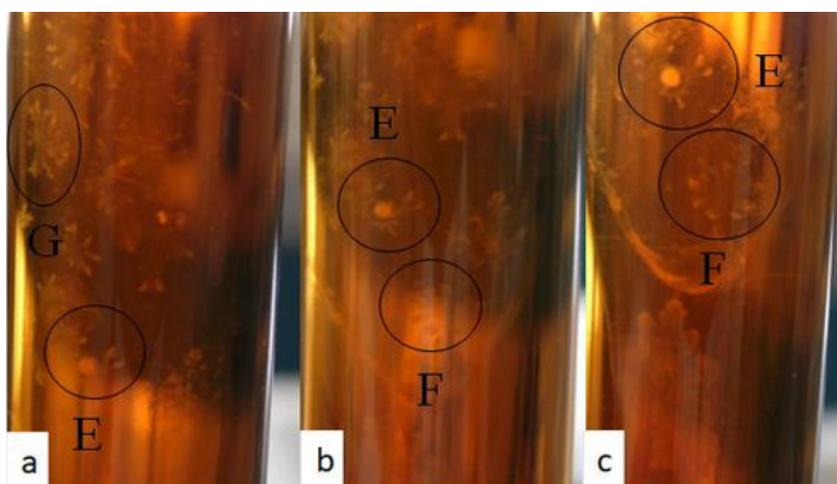


Figura 3. *L. innocua* aislamiento F-621. Diferentes morfologías tipo copo de nieve (**E**, **F** y **G**) y cambios en su biomasa durante el período enero a marzo 2020. **a)** Enero 2020 macrocolonia E tenue con extremos blancuecinos. Ausencia de colonia F. **b)** Febrero 2020 aumento de densidad en la biomasa de la colonia E. Surgimiento de la colonia F. **c)** Marzo 2020 aumentos en la densidad de biomasa en las colonias E y F.

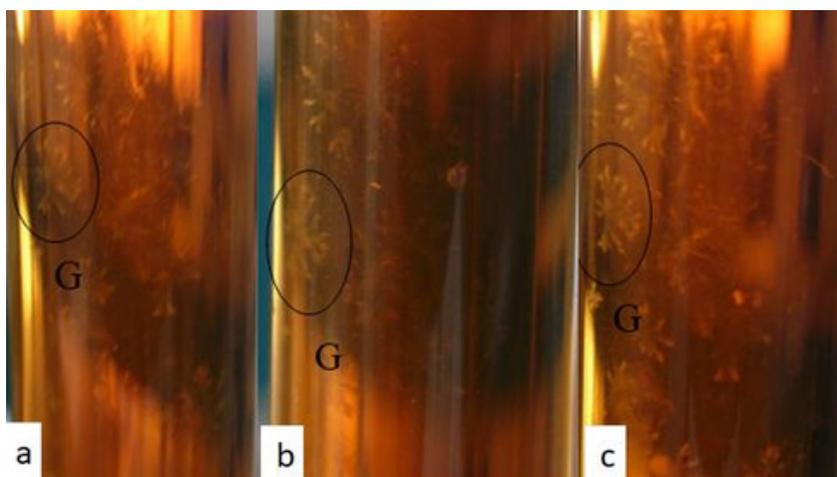


Figura 4. *L. innocua* aislamiento F-621. Cambios en macrocolonia G tipo copo de nieve. **a).** Enero 2020 macrocolonia con extremos blancuecinos densos y bien delimitados. **b)** Febrero 2020 macrocolonia, con menor cantidad de biomasa respecto a enero. **c)** Marzo 2020 macrocolonia muestra extremos blancuecinos menos densos y difuminados.

Cuadro 1. Número de aislamientos de *Listeria innocua* con cambios en macrocolonias ( $\geq 1$  mm) respecto al mes anterior durante el período agosto 2019 a marzo 2020 (N= 30 aislamientos).

Mes	Macrocolonias						
	Presentes	Ausentes	Sin Cambio	Con Cambio			
				Surgen	Aumentan	Disminuyen	Desaparecen
Agosto (mes inicial)	21	9	–	–	–	–	–
Septiembre	–	2	17 a	4	4	3	0
Octubre	–	2	17 a	1	4	3	3
Noviembre	–	2	15 a	2	8	2	1
Diciembre	–	2	20 a	2	2	2	2
Enero	–	2	6 b	2	5	4	11
Febrero	–	2	17 a	2	3	5	1
Marzo	–	2	21 a	2	0	3	2

La letra a indica que los valores no fueron estadísticamente significativos respecto a los otros meses. La letra b indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) respecto a los otros meses. El intervalo de confianza de riesgo relativo para el mes de enero (1.63 a 2.85), indica que la asociación fue a presentar cambios en ese mes.

Cuadro 2. Número de aislamientos de *Listeria innocua* con cambios en microcolonias (0.2 a 0.9 mm) respecto al mes anterior durante el período agosto 2019 a marzo 2020 (N= 30 aislamientos).

Mes	Microcolonias						
	Presentes	Ausentes	Sin Cambio	Con Cambio			
				Surgen	Aumentan	Disminuyen	Desaparecen
Agosto (mes inicial)	14	16	–	–	–	–	–
Septiembre	–	5	15 a	1	5	2	2
Octubre	–	5	15 a	2	6	2	0
Noviembre	–	5	13 a	1	3	7	1
Diciembre	–	5	20 b	0	2	2	1
Enero	–	5	5 b	7	7	5	1
Febrero	–	5	2 b	4	9	9	1
Marzo	–	5	13 a	1	4	7	0

La letra a indica que los valores no fueron estadísticamente significativos respecto a los otros meses. La letra b indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) respecto a los otros meses. El intervalo de confianza de riesgo relativo para el mes de diciembre (0.15 a 0.76) indica que la asociación fue hacia no presentar cambios; los intervalos de confianza en los meses de enero (1.28 a 2.15) y febrero (1.62 a 2.46) muestran que la asociación fue a presentar cambios en esos meses.

Todos los aislamientos presentaron al menos un cambio (Figuras 6 a 10). En 17 aislamientos se observaron tanto aumentos como disminuciones en

el número de macrocolonias y/o microcolonias presentes en un mes, respecto al anterior (Figuras 6a, 6b, 7a, 7b, 7c, 7d, 7e, 7f, 7g, 8a, 9a, 9b).

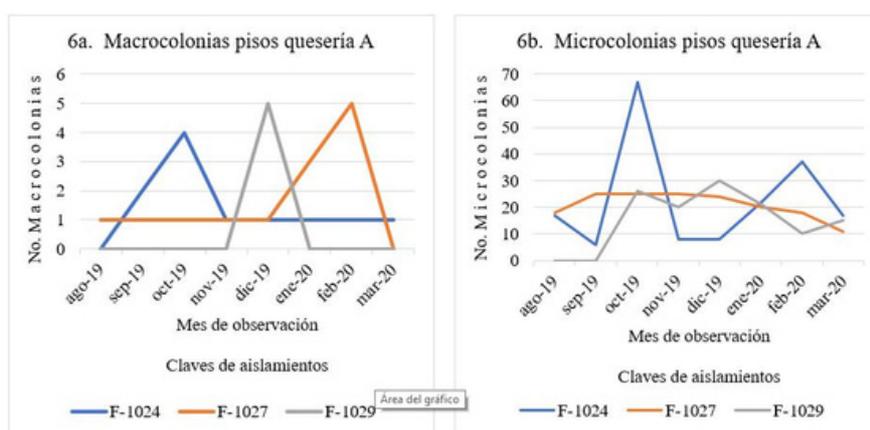


Figura 6. Cambios en el número de macro y microcolonias de aislamientos de *Listeria innocua* procedentes de la quesería A durante el período agosto 2019 a marzo 2020.

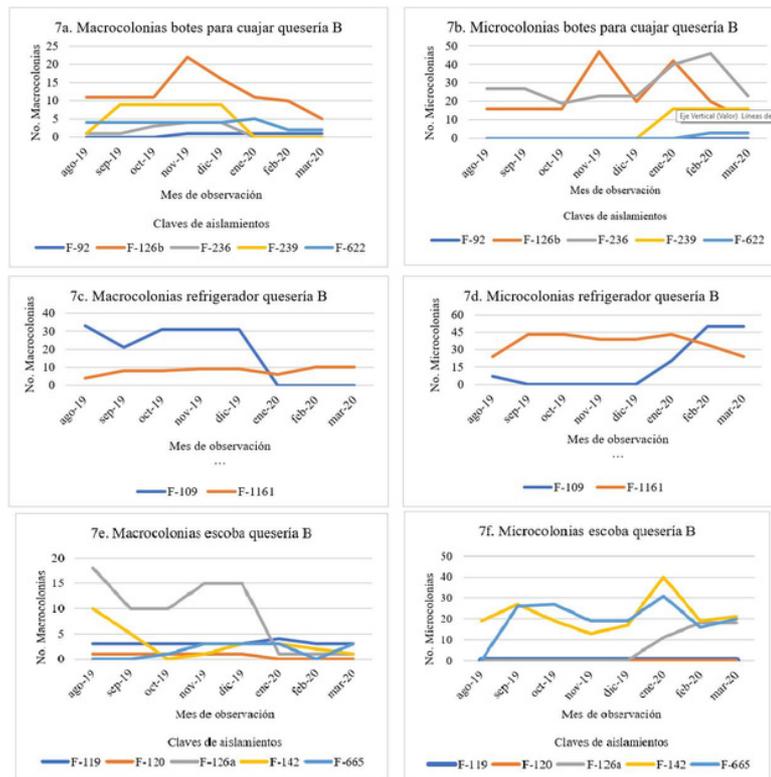
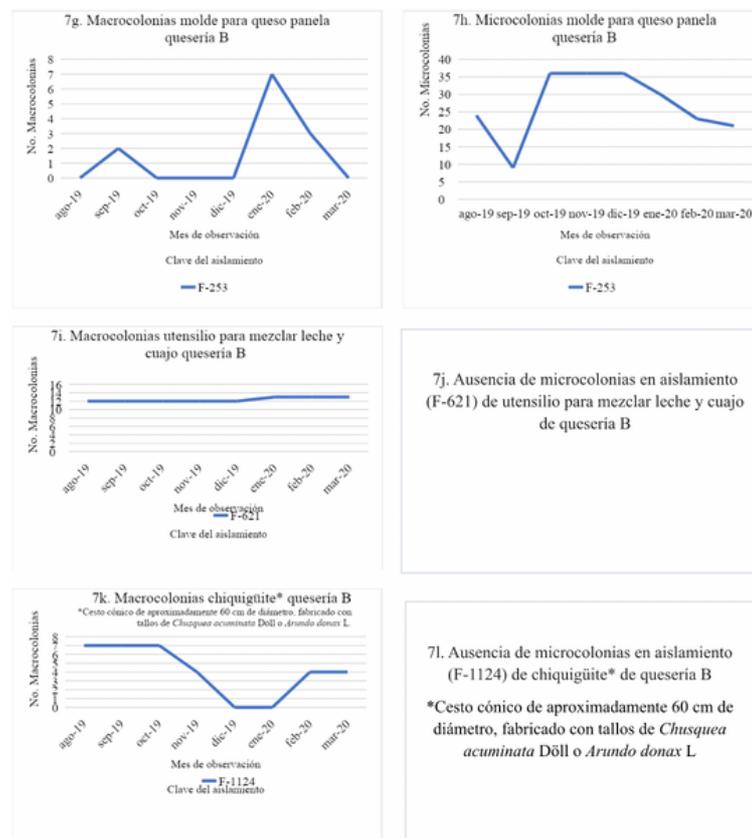


Figura 7. Cambios en el número de macro y microcolonias de aislamientos de *Listeria innocua* procedentes de la quesería B durante el período agosto 2019 a marzo 2020. Continúa...



... Continuación. Figura 7. Cambios en el número de macro y microcolonias de aislamientos de *Listeria innocua* procedentes de la quesería B durante el período agosto 2019 a marzo 2020.

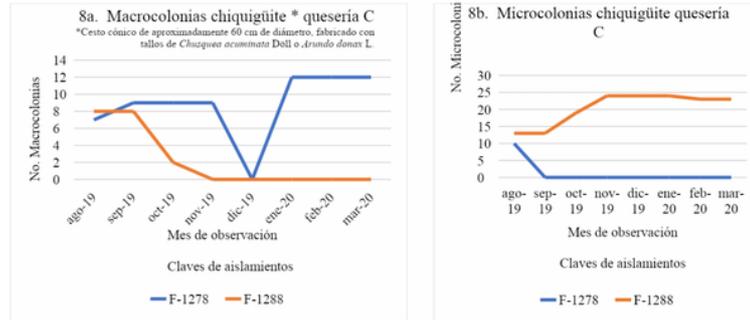


Figura 8. Cambios en el número de macro y microcolonias de aislamientos de *Listeria innocua* procedentes de la quesería C durante el período agosto 2019 a marzo 2020.

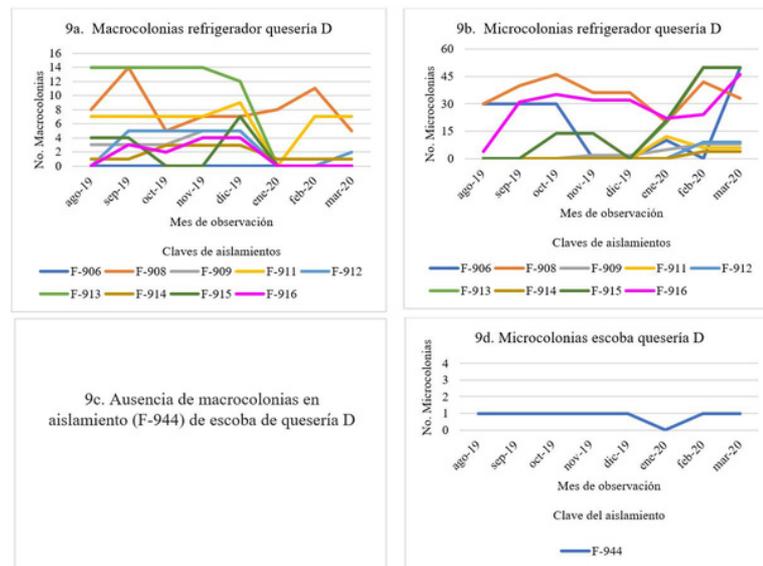


Figura 9. Cambios en el número de macro y microcolonias de aislamientos de *Listeria innocua* procedentes de la quesería D durante el período agosto 2019 a marzo 2020.

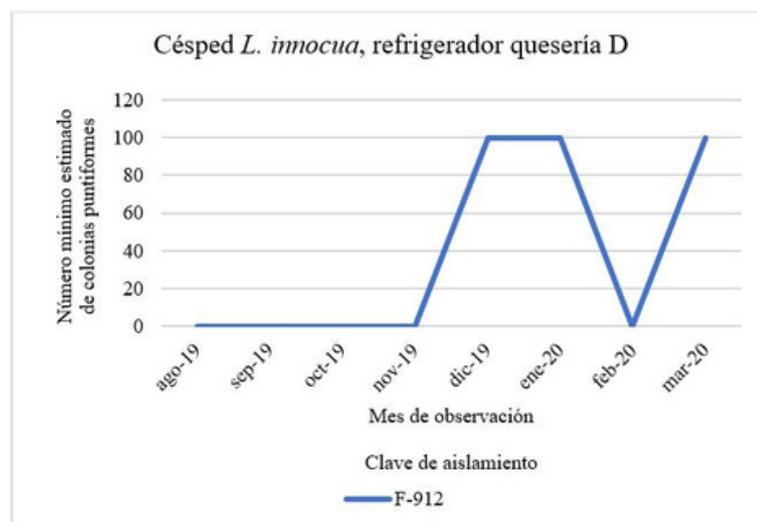


Figura 10. Ausencia, surgimiento y desaparición de césped en un aislamiento de *L. innocua* durante el período agosto 2019 a marzo 2020.

El cambio relativo expresado en Log<sub>10</sub> mostró que los límites de aumento y disminución para macrocolonias fueron, respectivamente, 0.032 a 1 Log<sub>10</sub> y de - 0.039 a -1 Log<sub>10</sub>. Para microcolonias los límites se ubicaron en 0.011 a 1.47 y de -0.012 a -0.505 Log<sub>10</sub>.

Los tiempos de generación calculados para las macrocolonias oscilaron de 10 a 260 días con una moda de 19 días y de las microcolonias fueron 10 a 551 días con una moda de 23 días.

La coexistencia de macrocolonias y microcolonias, ocurrió en 23 aislamientos (77 %) (Figuras 1 y 6 a 9).

Los 11 aislamientos cuyas macrocolonias desaparecieron en el mes de enero procedieron de las queserías A, B y D (Cuadro 1). La ausencia de cambios en microcolonias en diciembre fue observada en aislamientos de las 4 queserías (Cuadro 2). En enero, los surgimientos de microcolonias correspondieron a aislamientos de las queserías B y D, en tanto que los aumentos se presentaron en aislamientos de las queserías A, B y D (Cuadro 2). En febrero los surgimientos de microcolonias procedieron de las queserías B y D, los aumentos de A, B y D y las disminuciones estu-

vieron presentes en aislamientos de las 4 queserías (Cuadro 2). Lo anterior muestra que los cambios no estuvieron relacionados a una sola quesería o punto de muestreo.

En 2 aislamientos (F-906 y F-944), ambos de la quesería D, no hubo macrocolonias, pero si microcolonias (Figuras 9a y 9c). En 5 aislamientos de la quesería B (F-92, F-119, F-120, F-621, y F-1124), no se observaron microcolonias, pero si macrocolonias (Figuras 7b, 7f, 7j, 7l). Un aislamiento de la quesería D (F-912) presentó 3 morfologías con la siguiente dinámica: en los meses de septiembre a noviembre; solo se observaron macrocolonias; en diciembre coexistieron macrocolonias y césped; en enero solo hubo césped, en febrero desapareció el césped y surgieron microcolonias; finalmente, en marzo estuvieron presentes las tres morfologías. (Figuras 9a, 9b y 10).

El análisis de tendencia durante el período (Figuras 11 y 12) puso en evidencia comportamientos diferentes entre macro y microcolonias que a continuación se describen.

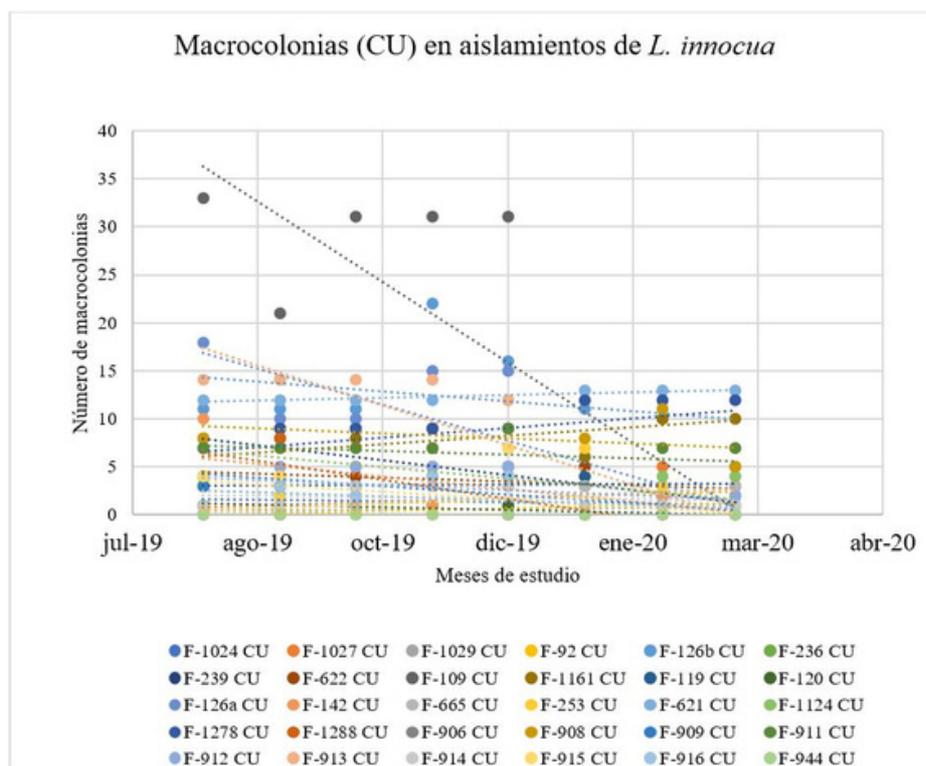


Figura 11. Regresiones lineales de las tendencias temporales del número de macrocolonias en aislamientos de *L. innocua* durante el periodo agosto 2019 a marzo 2020.

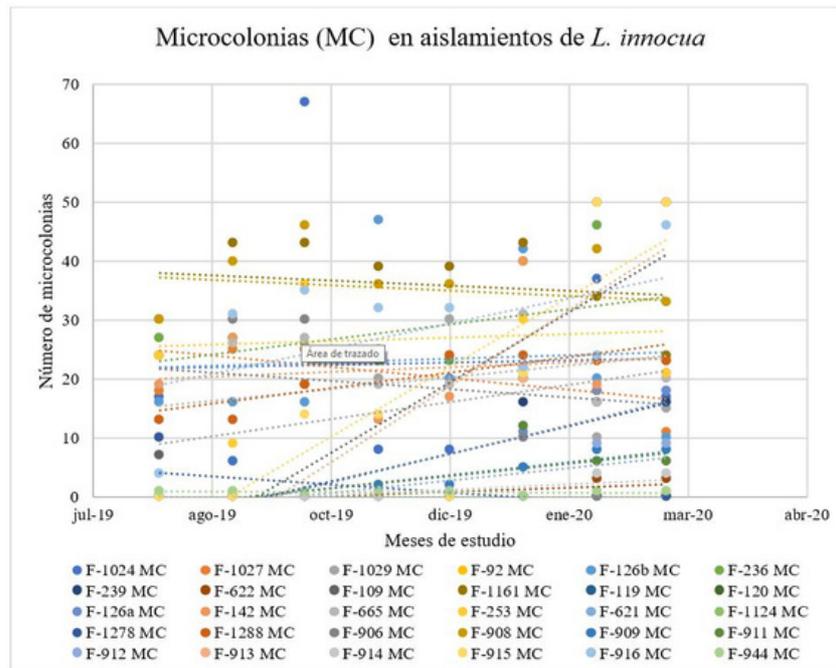


Figura 12. Regresiones lineales de tendencias temporales del número de microcolonias en aislamientos de *L. innocua* durante el periodo agosto 2019 a marzo 2020.

### Macrocolonias ( $\geq 1$ mm) de *L. innocua*

En 28 aislamientos (93 %) se observó el surgimiento de 1 a 12 colonias (aislamientos F- 92, Figura 7a y F- 1278, Figura 8a, respectivamente), con un promedio de 5 a 6 colonias durante los meses de agosto a diciembre y de 2 a 3 colonias en los meses de enero a marzo.

Hubo un aumento, estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), en la ocurrencia de cambios durante el mes de enero (Cuadro 1). En 15 de los 22 aislamientos que presentaron cambios, estos consistieron en la disminución o desaparición de las macrocolonias (Cuadro 1).

De agosto a marzo, 20 aislamientos (67 %) presentaron una tendencia descendente en tanto que tendencias ascendentes fueron presentadas por: 4 aislamientos de la quesería B (escoba, utensilio para mezclar leche y cuajo, moldes para panela, y refrigerador), 3 procedentes del piso de la quesería A y 1 del chiquigüite de la quesería C (Figuras 6, 7, 8 y 11). En dos aislamientos no hubo macrocolonias.

El cambio relativo en  $\text{Log}_{10}$  pudo calcularse en 25 aislamientos. El menor aumento fue de  $0.032 \text{ Log}_{10}$  cuando el número de este tipo de colonias pasó de 12 en el mes de diciembre, a 13 en el mes de enero; esto ocurrió en un aislamiento procedente del utensilio para mezclar leche y cuajo de la quesería B

(F-621, Figura 7i). El mayor aumento fue de  $1 \text{ Log}_{10}$ , al aumentar de 2 macrocolonias en septiembre a 4 en octubre un aislamiento procedente del piso de la quesería A (F- 1024) y un aumento igual en un aislamiento del refrigerador de la quesería D (F-916) en los meses de octubre a noviembre (Figuras 6a y 9a). Las disminuciones se ubicaron en el rango de  $-0.039$  a  $-1 \text{ Log}_{10}$  correspondiendo la menor disminución a un aislamiento a partir de los botes para cuajar de la quesería B (F-126b) que en enero contaba con 11 macrocolonias y 10 en febrero. La mayor disminución se observó en un aislamiento de escobas de la quesería B (F-126a) que en diciembre mostraba 15 colonias y 1 en enero (Figuras 7a y 7e).

En 19 aislamientos pudo calcularse al menos un tiempo de generación durante el período de estudio. El tiempo mínimo de generación fue de 10 días en el mes de septiembre y el mayor tiempo de generación fue de 260 días identificado en el mes de enero. No fue posible calcular tiempos de generación en el mes de marzo porque en ese mes, el número de macrocolonias disminuyó o se mantuvo sin cambio respecto a febrero. No se identificó una relación entre patrones de tiempos de generación con relación a los puntos de muestreo y/o las queserías. Solo 2 aislamientos, uno de la quesería B y otro de la D, presentaron un tiempo de generación idéntico de 30 días en el mes de noviembre (Cuadro 3).

Cuadro 3. Aislamientos de *L. innocua* que presentaron tiempos de generación idénticos.

Tipo de colonia	Quesería	Clave y fuente de aislamiento	Tiempo de generación (en días) y mes	Fecha de aislamiento
<b>Macrocolonias</b>				
	B	F-126b (botes para cuajada)	30 d noviembre	15 marzo 1999
	D	F-916 (refrigerador)	30 d noviembre	03 agosto 1999
<b>Microcolonias</b>				
	B	F-109 (refrigerador)	23 d febrero	15 de marzo 1999
	D	F-913 (refrigerador)	23 d febrero	03 de agosto 1999

En el período septiembre a marzo se observaron tiempos de generación diversos y cambios abruptos en los tiempos de generación de un mes respecto al siguiente (Cuadro 4). Los cambios abruptos en tiempos de generación de las macrocolonias de *L. innocua* se registraron en 3 queserías diferentes; se presentaron alargamientos de 72 y 41 días en los meses de noviembre y febrero, respectivamente (Cuadro 4). El cambio más extremo en macrocolonias fue del aislamiento F-908 del refrigerador de la quesería D en el cual el tiempo de generación en enero fue de 156 días y en febrero de 65 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cambios abruptos en los tiempos de generación de macrocolonias de *L. innocua*.

Quesería	Clave y fuente de aislamiento	Tiempo de generación (en días)		Fecha de aislamiento
		Mes 1	Mes 2	
A	F-1027 (pisos)	20 d enero	41 d febrero	10 agosto 1999
B	F-236 (botes para cuajar)	19 d octubre	72 d noviembre	15 de marzo 1999
D	F-908 (refrigerador)	156 d enero	65 d febrero	03 agosto 1999

### Microcolonias (0.2 – 0.9 mm) de *L. innocua*

No hubo microcolonias en 5 aislamientos de la Quesería B (F-92, F-119, F-120, F-621, F-1124). En 25 aislamientos (83 %) el número de microcolonias osciló de 1 a 67 (aislamientos F-944 y F-1024, Figuras 9d y 6b, respectivamente). En el periodo agosto a diciembre 2019 el promedio mensual de microcolonias, fue de 8 a 14, en tanto que en el período enero a marzo 2020 fue de 15 a 18 microcolonias.

Las microcolonias presentaron dos asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ): una a no presentar cambios durante el mes de diciembre y otra a presentar cambios en los meses de enero y febrero (Cuadro 2).

Se registró una tendencia ascendente en 19 aislamientos (63 %); 8 de ellos, procedentes de refrigeradores de las queserías B y D (Figura 12). En 6 aislamientos, procedentes de las 4 queserías se observó una tendencia descendente (Figura 12).

No fue posible obtener información acerca del cambio relativo en logaritmos a partir de 12 aislamientos porque: no hubo presencia de microcolonias en todo el período (5 aislamientos), los valores fueron de 0 indicando ausencia de cambio logarítmico (5 aislamientos) o los datos fueron insuficientes para hacer cálculos logarítmicos (2 aislamientos). En este último caso, el aislamiento del chiquigüite de la quesería C (F-1278) presentó 10 colonias en agosto las cuales desaparecieron en septiembre; el otro aislamiento, procedente de la escoba de la quesería D (F-944) presentó solo una colonia que persistió de agosto a diciembre, desapareció en enero y en febrero surgió nuevamente solo una colonia (Figuras 8b y 9d).

En 18 aislamientos el rango de aumento de microcolonias fue de 0.011 a 1.47 Log10, el primer valor se presentó en un aislamiento de escoba de la quesería B (F-665) con un cambio de 26 colonias en el mes de septiembre a 27 colonias en el mes de octubre (Figura 7f). El segundo valor se registró en un aislamiento del refrigerador de la quesería D (F-916) en el cual en el mes de agosto había 4 colonias y en el mes de septiembre 31 (Figura 9b).

En 17 aislamientos fue posible calcular al menos un tiempo de generación. Los tiempos de generación mínimos y máximos fueron, respectivamente, de 9 y 551 días.

Las microcolonias de los aislamientos de los refrigeradores de las queserías B (F-109) y D (F-913) presentaron el mismo tiempo de generación: 23 días en el mes de febrero (Cuadro 3). Se identificaron tiempos de generación muy próximos en 3 aislamientos obtenidos en la misma fecha (3 de agosto 1999): F-913, F-915 y F-908, procedentes del refrigerador de la quesería D que, en el mes de febrero, presentaron tiempos de generación de 23, 24 y 28 días, respectivamente.

Al menos un aislamiento de cada quesería presentó

cambios abruptos en los tiempos de generación de las microcolonias (Cuadro 5). En los meses de octubre, noviembre y febrero ocurrieron alargamientos de 34 a 161 días mientras que, en enero y marzo se reportaron acortamientos mayores a 100 días (Cuadro 5). Los 2 aislamientos de la quesería B que presentaron cambios abruptos fueron aislados en la misma fecha de diferentes puntos y sus tiempos de generación fueron diferentes (Cuadro 5). Los 3 aislamientos de la quesería D que presentaron cambios abruptos fueron aislados del mismo punto (refrigerador) y en la misma fecha; el aislamiento F-916 presentó dos veces cambios abruptos en sus tiempos de generación, la primera fue un alargamiento en el tiempo de generación de octubre respecto a septiembre y la segunda fue un acortamiento de marzo respecto a febrero, en ambos cambios los tiempos de generación fueron mayores a 150 días (Cuadro 5).

Cuadro 5. Cambios abruptos en los tiempos de generación de microcolonias de *L. innocua*.

Quesería	Clave y fuente de aislamiento	Tiempo de generación (en días)		Fecha de aislamiento
		Mes 1	Mes 2	
A	F-1024 (pisos)	21 d enero	40 d febrero	10 de agosto 1999
B	F-142 (escobas)	78 d diciembre	24 d enero	15 de marzo 1999
B	F-236 (botes para cuajar)	38 d enero	149 d febrero	15 de marzo 1999
C	F-1288 (chiquiglite)	55 d octubre	89 d noviembre	20 de agosto 1999
D	F-908 (refrigerador)	72 d septiembre	149 d octubre	03 agosto 1999
D	F-909 (refrigerador)	23 d enero	44 d febrero	03 agosto 1999
D	F-916 (refrigerador)	10 d septiembre y 239 d febrero	171 d octubre y 32 d marzo	03 agosto 1999

### Césped en *Listeria innocua*

Las colonias puntiformes se presentaron de forma abundante y muy próxima entre sí, dando una apariencia de cubrir la superficie como lo hace el pasto, de ahí el término césped (Figuras 1 y 10). Esta situación impidió hacer un recuento adecuado por lo que se optó por registrar su ausencia, presencia o persistencia mediante un número fijo (100 colonias) lo que permitió graficar sus cambios

Solo un aislamiento de *L. innocua*, obtenido del refrigerador de la quesería D (F-912) presentó césped; este césped surgió en diciembre, persistió durante enero y febrero para luego desaparecer en marzo (Figura 10).

### Temperaturas registradas durante el período de estudio

De acuerdo con los registros del Instituto de Astronomía y Meteorología (IAM) de la Universidad de Guadalajara, durante el período de estudio las temperaturas mínimas fueron entre 4.3 y 7.2 °C, presentándose en los meses de diciembre, enero y febrero (Cuadro 6). Las temperaturas máximas fueron de 31.6 a 35.6 °C registrándose en los meses de agosto, septiembre, octubre, febrero y marzo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Temperaturas máximas y mínimas registradas en el período agosto 2019 a marzo 2020.

Año	Mes	Temperatura °C		Temperatura °C	
		Mínima	Máxima	Mínima	Máxima
		IAM*	IAM	Laboratorio	Laboratorio
2019	agosto	15.5	31.6	- **	-
	septiembre	15.8	31.6	-	-
	octubre	18.8	31.7	-	-
	noviembre	11.8	29.7	-	-
2020	diciembre	7.2	29.9	-	-
	enero	4.3	28.4	-	-
	febrero	6.7	32.4	21	32
	marzo	12.9	35.6	21	27

\*IAM = Instituto de Astronomía y Meteorología de la Universidad de Guadalajara, Estación Meteorológica ubicada en Guadalajara, Jalisco.  
\*\*No registradas por falta de equipo.

Las temperaturas dentro del área de conservación de los aislamientos pudieron registrarse a partir de febrero de 2020 cuando se tuvo acceso al equipo adecuado para ello. En febrero y marzo las temperaturas mínimas y máximas fueron, respectivamente, de 21 y 32 °C.

### Discusión

En un período de 7 meses todos los aislamientos presentaron al menos un tipo de cambio. Ocurrieron surgimientos, aumentos, disminuciones y desapariciones de macrocolonias, microcolonias

y césped, también se presentaron variaciones en la densidad de la biomasa de diferentes colonias, indicando en conjunto que, en un medio bifásico, los aislamientos de *L. innocua* permanecieron activos durante la fase de sobrevivencia a largo plazo. Las estrategias combinadas de *Escherichia coli* para sobrevivir por tiempos prolongados sin adición de nuevos nutrientes consisten en reciclar los detritos celulares y coexistencia de clonas que evolucionan simultáneamente con mutaciones que le permiten mayor eficiencia en la eliminación de residuos tóxicos (Ratib *et al.*, 2021), es posible que *L. innocua* utilicen estas mismas estrategias de sobrevivencia y que las diferentes morfologías sean evidencia de esas mutaciones.

La variedad de morfologías mostradas por aislamientos de *L. innocua* (Figuras 3 - 5) fue relacionada a medios que presentaron mayor resequedad y las morfologías coinciden con el tipo de crecimiento que presenta *Bacillus subtilis* cuando se combinan condiciones de nutrientes escasos, (menos de 1g de peptona por litro) y concentraciones de agar superiores a 0.8 % la cual les impide moverse por la superficie (Ben-Jacob *et al.*, 2000). Los cambios aparentes en la cantidad de biomasa en algunas macrocolonias (Figuras 3 - 5) sugieren fluctuaciones en la cantidad de células presentes en la colonia, como se reporta para *Paenibacillus dendritiformis* (Ben-Jacob y Levine, 2006). Dado que las colonias se observan con menor densidad de biomasa en agosto y mayor en febrero, otra posibilidad es que la mayor densidad fuera una respuesta a las temperaturas frías propias del invierno.

En caldo soya tripticaseína adicionado de extracto de levadura con incubación a 35 °C/ 24 h, *L. innocua* alcanza su fase estacionaria con un promedio de población 9.59 log<sub>10</sub>. (Petran y Swanson, 1993), cifra que contrasta con el incremento máximo de 1 log<sub>10</sub> encontrado en este trabajo. Este último dato puede indicar cuál es el incremento máximo que puede alcanzar esta especie de *Listeria* en condiciones de temperatura variable y escasez de nutrientes.

En caldo soya tripticaseína a 30 °C el tiempo de generación de *L. innocua* es de 50.1 minutos (MacDonald y Sutherland, 1994). Solo 4 aislamientos presentaron tiempos de generación idénticos (Cuadro 3) sin embargo las fechas de aislamiento sugieren que se trató de la misma cepa,

aislada de diferentes puntos de las queserías (Cuadro 3). Los tiempos de generación pudieron ser influenciados por las variaciones en la temperatura ambiente, pero, dado que todos los tubos estuvieron sometidos a las mismas variaciones de temperatura lo esperado serían tiempos de generación homogéneos en todos los aislamientos, lo cual no ocurrió (Cuadros 4 y 5). Es posible que los rangos tan amplios de variaciones en los tiempos de generación (9 a 551 días) y los patrones de aumento y disminución logarítmicos pudieran estar relacionados con los microambientes propios de cada tubo.

En la fase de sobrevivencia a largo plazo surgen bacterias con mutaciones que las hacen metabólicamente diferentes por lo cual hay variación en la utilización de los nutrientes generando ambientes internos con diferente pH aun cuando todos hayan iniciado con condiciones idénticas (Finkel y Kolter, 1999; Wood *et al.*, 2009). Durante la fase de sobrevivencia a largo plazo de *E. coli*, el conjunto de nutrientes es dinámico y el medio ambiente dentro de los tubos es heterogéneo a medida que las bacterias se adaptan al reciclaje de desechos celulares, lo que genera nichos que favorecen a las poblaciones bacterianas que presentan mutaciones relacionadas con un metabolismo capaz de aprovechar los nutrientes disponibles o excretar de forma más eficiente los productos de desecho (Ratib *et al.*, 2021; Westphal *et al.*, 2018). Esto conduce a que ocurran coexistencia, predominio y sucesiones de bacterias con distintas mutaciones a través del tiempo (Ratib *et al.*, 2021). Es posible que los microambientes y las mutaciones influyeran en los tiempos de generación observados para *Listeria innocua*.

Hubo 5 aislamientos de *L. innocua* en que no se pudo calcular el tiempo de generación porque de un mes al siguiente solo había surgido una colonia y el logaritmo de 1 es 0 lo que impidió hacer los cálculos, o bien, desaparecieron las colonias lo que también generó valores de 0. Sin embargo, en 25 aislamientos se observó la relación inversa entre incremento logarítmico y tiempo de generación reportado para cultivos con condiciones óptimas (Duh y Schaffner, 1993). Sin embargo, no ocurrió un aumento exponencial en el número de colonias sino fluctuaciones abruptas combinadas con períodos sin cambio. (Figuras 6 a 10). Esto pudiera relacionarse

con respuestas en las que interviene el quorum sensing que detecta aumento en la densidad poblacional y/o disminución de nutrientes que induce apoptosis en la mayoría de las bacterias, lo que luego genera liberación de nutrientes a partir de las bacterias muertas y a partir de los cuales se alimentaran las bacterias sobrevivientes hasta que lleguen a un nuevo nivel crítico de población o de escasez de nutrientes (Finkel., 2006, Herbert y Foster, 2001, Wen *et al.*, 2009, 2011).

Los tiempos de generación mostraron rangos de 10 a 551 días y modas entre 19 a 23 días lo que pudo estar relacionado con: las características propias de cada aislamiento, los microambientes dentro de cada tubo y la participación de la temperatura en diferentes épocas del año. Sin embargo, la abundancia de las microcolonias fue diferente al de las macrocolonias (Figuras 6 -9) y lo mismo ocurrió con sus tiempos de generación. Estos resultados podrían significar que las microcolonias tienen mayor facilidad de crecimiento en los medios de cultivo lo que podría posteriormente dar paso a la generación de macrocolonias. También podría ser, como menciona Ratib *et al.*, (2021), una estrategia en donde diferentes subpoblaciones están presentes, pero crecen de forma asincrónica para optimizar los nutrientes.

El surgimiento y desaparición de macro y micro colonias en *L. innocua* pudieran estar relacionados con el quorum sensing, pero también con sucesiones de mutantes como las descritas para *E. coli* (Riedel *et al.*, 2013).

El hecho de que los cambios estuvieron presentes en aislamientos de las 4 queserías y las diferencias estadísticas encontradas para macrocolonias en el mes de enero y para microcolonias en diciembre, enero y febrero (Cuadros 1 y 2) indican que la temperatura influye de forma diferente en los cambios que presentan estos fenotipos. *Listeria innocua* sobrevive mejor en invierno a temperaturas de  $2.3$  a  $10.7 \pm 3$  °C (Girardin *et al.*, 2005). En enero las macrocolonias tendieron a desaparecer en tanto que en enero y febrero las microcolonias presentaron mayor dinamismo (Cuadros 1 y 2.), esto sugiere que las temperaturas ambiente más frías pudiera ser un factor que favorezca a las colonias pequeñas e inhiba a las grandes. El comportamiento de las microcolonias de *L. innocua* fue opuesto al que presentan las colo-

nias pequeñas de *S. aureus* las cuales disminuyen su crecimiento conforme disminuye la temperatura (Proctor *et al.*, 2014).

En el Manual de Bergey's (McLauchlin y Rees, 2009), se menciona que los cultivos viejos de *Listeria* (3 a 7 días en caja de Petri) presentan colonias grandes de 3 a 5 mm de diámetro, por ello es posible que las macrocolonias correspondieron a un fenotipo de *Listeria* que suele presentarse en cultivos envejecidos. Las macrocolonias estuvieron presentes en el 93% de los de *L. innocua*. El rango de macrocolonias de *L. innocua* fue de 1 a 12. En *L. innocua* la tendencia de agosto a marzo fue descendente y el fenómeno de disminución o desaparición de macrocolonias estuvo asociado al mes de enero. Esto sugiere que las temperaturas bajas del invierno pudieran ser inhibitorias para este tipo de colonias.

Colonias pequeñas también han sido observadas en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (Finkel y Kolter, 1999; Proctor *et al.*, 2014; Wood *et al.*, 2005). La presencia de este tipo de morfología se atribuye a microambientes que se generan dentro de los medios de cultivo y a variabilidad genética que presentan los aislamientos (Ben- Jacob *et al.*, 2000; Finkel y Kolter, 1999; Wood *et al.*, 2005). En *Streptococcus pyogenes*, en cultivos de más de 4 semanas, las poblaciones sobrevivientes crecen con fenotipos alterados produciendo pequeñas colonias y colonias grandes atípicas, estos fenotipos son estables por más de 200 generaciones cuando son cultivados en cajas de agar Todd Hewitt (Wood *et al.*, 2005).

Los aislamientos estudiados en este trabajo, correspondieron al tipo de cultivo llamado en inglés *batch culture* y que se traduce como cultivos discontinuos o cultivos por lotes; este tipo de cultivos son un sistema cerrado en el que todos los nutrientes son añadidos al inicio (Finkel y Kolter, 1999; Finkel, 2006). La existencia de subpoblaciones de *Listeria* en cultivos por lotes ocurre dentro de una misma colonia donde se aprecian células jóvenes y viejas (Rebuffo-Scheer *et al.*, 2008). Otro tipo de subpoblaciones de *Listeria* encontrado en este tipo cultivos consiste en colonias de diferentes tamaños (Verheyen *et al.*, 2019).

La presencia de macro y microcolonias en los aisla-

mientos de *L. innocua* coinciden con los hallazgos reportados en *Streptococcus pyogenes* donde ocurre un cambio en la morfología de colonias procedentes de cultivos envejecidos en Caldo Todd Hewitt durante 8 semanas que al sembrarse en Agar Todd Hewitt presentan conjuntamente colonias grandes atípicas y microcolonias (Wood *et al.*, 2005). La existencia de diferentes morfologías pudiera estar relacionada con poblaciones metabólicamente diversas que equilibran la producción de ácido con la producción de amoníaco para mantener el pH del medio arriba de 5.6, necesario para la sobrevivencia de *S. pyogenes*, (Wood *et al.*, 2009).

En el medio líquido de Luria Bertani, durante la fase de sobrevivencia a largo plazo *E. coli* genera una diversidad genética que puede demostrarse mediante la observación de la morfología microscópica y colonial a partir de tomar muestras del cultivo conforme va envejeciendo (Finkel, 2006). La ocurrencia de variabilidad morfológica durante la sobrevivencia a largo plazo se registra en *E. coli* conservada en caldo Luria Bertani y se caracteriza por el surgimiento a los 150 días, de tres clases de colonias distintas (morfotipos): colonias de color crema, colonias blancas y mini colonias complementada a los 180 días con otras 2 morfologías denominadas de “huevo frito” y “muy pequeña o “nano” (Finkel y Kolter, 1999). Todas estas nuevas morfologías son genéticamente estables (Finkel y Kolter, 1999). La presencia de macrocolonias, microcolonias y césped en los aislamientos de *L. innocua* sugieren que en el medio bifásico empleado también ocurrieron mutaciones.

Las microcolonias tendieron a ser más abundantes que las macrocolonias, esto pudiera estar relacionado con la posibilidad de que en este tipo de estructuras ocurriera el mismo fenómeno que se observa en biopelículas, donde, los tamaños pequeños de las células favorecen un mejor acceso a nutrientes y mejores tasas de reproducción (Johnson, 2008).

En la etapa de sobrevivencia a largo plazo, *E. coli* presenta 4 diferentes fenotipos: Clase I, las células viejas predominan y conducen casi a la extinción de las células jóvenes, Clase II donde coexisten células viejas y jóvenes, Clase III, las células jóvenes superan a las células viejas, y Clase IV las

células viejas son incapaces de competir con las células jóvenes (Finkel, 2006). No se encontró una explicación al porqué la presencia de solo un morfotipo o de césped fuera escasa. Los 2 aislamientos de *L. innocua* en los que se observó solo un tipo de colonias pudiera atribuirse a que en ellos ocurrió un fenotipo tipo Clase I o Clase IV.

La coexistencia de macro y microcolonias en porcentajes de 77% en *L. innocua*, así como la presencia de césped en los meses con temperaturas más bajas muestra la existencia de subpoblaciones que junto con el aumento de densidad en colonias rizoides pueden representar diferentes estrategias para asegurar la sobrevivencia en condiciones adversas. Durante la sobrevivencia a largo plazo de *E. coli* surgen linajes genética y fisiológicamente distintos que ocupan nichos diferentes en el entorno y pueden tener interacciones sintróficas (en las que los metabolitos producidos por un microorganismo son útiles para otro), lo cual explicaría su coexistencia (Ratib *et al.*, 2021). Esto mismo pudiera estar ocurriendo con las macro y micro colonias de *Listeria*. Las macrocolonias y microcolonias de *Listeria innocua* presentaron tendencias opuestas a través del tiempo, descendente para macrocolonias y ascendente para microcolonias; esto sugiere la coexistencia de diferentes subpoblaciones cuyos crecimientos asincrónicos pudieran ser una estrategia para turnarse el uso de nutrientes.

En condiciones de escasez de nutrientes, *E. coli* desarrolla subpoblaciones de células que pueden crecer como un subgrupo dominante porque presentan mutaciones relacionadas con el gen *rpos819* que da origen al fenotipo GASP (Growth Advantage Stationary Phase), fenotipo que crece en la fase estacionaria de largo plazo y puede derivar en poblaciones genéticamente diferentes que coexisten con otras subpoblaciones que se generan a través del tiempo y tienen una mejor capacidad de sobrevivencia en condiciones de inanición mediante el aprovechamiento de los aminoácidos y del ADN, procedentes de bacterias que mueren (Finkel, 2006; Finkel y Kolter, 2001; Zinser y Kolter, 1999). El surgimiento, coexistencia y desaparición de colonias con diversas morfologías en los aislamientos de *Listeria innocua* coincide con el comportamiento dinámico que presenta *E. coli* durante la fase de sobrevivencia a largo plazo (Finkel y Kolter, 1999; Ratib *et al.*, 2021).

En el período 2000 a 2020, enero ha sido el mes más frío en Guadalajara, registrándose 2.6 °C, 16.5 y 31.1 °C como temperaturas mínima promedio y máxima, respectivamente. (Instituto de Astronomía y Meteorología de la Universidad de Guadalajara, 2021). En enero de 2020 las temperaturas mínima, promedio y máxima en Guadalajara fueron 5.4, 15.9 y 31.6 (Instituto de Astronomía y Meteorología de la Universidad de Guadalajara, 2021) correspondiendo a la temperatura más baja registrada durante el período del estudio (Cuadro 6). Solo se pudieron registrar las temperaturas a las que se encontraban los aislamientos durante los meses de febrero y marzo 2020 (Cuadro 6), sin embargo, las diferencias estadísticas encontradas (Cuadros 1 y 2) muestran que las macro y las microcolonias respondieron de forma diferente ante las bajas temperaturas de enero 2020 (Cuadro 6); las cuales posiblemente tuvieron un efecto de estimulación del crecimiento para las microcolonias y de inhibición para las macrocolonias. Las temperaturas registradas en la gaveta donde se conservan los aislamientos, en enero de 2021 fueron de 15 °C la mínima y 21 °C la máxima (Datos generados con posterioridad al período reportado en este artículo).

En el binomio suelo-perejil con un rango de temperatura de 2.3 a 24.5 °C en condiciones de campos fertilizados con composta orgánica, *L. innocua* sobrevive mejor en el invierno que en la primavera (Girardin *et al.*, 2005).

Si bien los aislamientos de *Listeria* se mantuvieron a temperaturas mayores a las de refrigeración, siempre fueron menores a 35 °C y sin adición de nuevos nutrientes, por lo anterior se considera que las microcolonias que surgieron o persistieron en los aislamientos pudieran ser variantes adaptadas a temperaturas frías. También, es posible que las macrocolonias sean un fenotipo menos adaptado al frío, por ello pudieran presentar menor número de cambios o desaparecer en los meses de diciembre a febrero.

Los tiempos de generación idénticos en microcolonias ocurrieron en enero y febrero (Cuadro 3) esto sugiere una posible interacción de este tipo de subpoblación con la temperatura de esos meses.

Las variaciones de 1 a 7 días en los tiempos de generación de microcolonias de 3 aislamientos ob-

tenidos del mismo punto de muestreo y/o en las mismas fechas sugieren la posibilidad de que se trate de la misma cepa y que las variaciones reflejen la interacción de la cepa con la temperatura y el microambiente de cada tubo.

No se identificó un patrón en los cambios abruptos de los tiempos de generación de macrocolonias salvo que 2 de los 3 tiempos de generación ocurrieron en febrero (Cuadro 4) y que 3 aislamientos de macrocolonias de *L. monocytogenes* también presentaron cambios abruptos en febrero (datos aún no publicados), esto se considera un elemento a favor de la posible interacción entre la temperatura y los microambientes de cada tubo.

Las microcolonias de *L. innocua* en 3 aislamientos de la quesería D aislados en la misma fecha y del mismo punto mostraron tiempos de generación diferentes (Cuadro 5) esto puede estar relacionado con la influencia del microambiente existente en cada tubo.

Las variaciones en los tiempos de generación (Cuadros 4 y 5) pudieran atribuirse a los microambientes de cada tubo y a que los aislamientos, conservados a temperatura ambiente, estuvieron sujetos a variaciones de temperaturas dentro del rango de 0 a 45 °C en el que sobrevive y desarrolla *Listeria* (McLauchlin y Rees, 2009).

El crecimiento bacteriano es influido por 3 factores: a) las características fisiológicas propias de cada microorganismo, b) la disponibilidad de nutrientes y c) la temperatura adecuada para el crecimiento de la bacteria (Jarvis *et al.*, 2016; MacDonald y Sutherland, 1994; Maier, 2009). Los tiempos de generación de microcolonias en el mes febrero son sugerentes de la interacción de los microambientes de cada tubo con la influencia de las temperaturas de invierno en los tiempos de generación de las microcolonias.

El patrón observado en el césped de *Listeria innocua* aislada del refrigerador de la quesería D (Figura 10) es idéntico al mostrado por un aislamiento de *Listeria monocytogenes* obtenido del refrigerador de la quesería A (dato aun no publicado) lo que sugiere la participación del punto de muestreo de donde se obtuvieron los aislamientos.

Los estudios que se han publicado acerca de la sobrevivencia a largo plazo de *Listeria* en medio de

cultivo de laboratorio se basan en medios líquidos incubados a temperaturas constantes de 4°C, 20 °C, 35 °C y 37 °C (Arguedas-Villa *et al.*, 2010; Herbert y Foster, 2001; Hingston *et al.*, 2019; Shamloo *et al.*, 2018; Wen *et al.*, 2013) o en observaciones al microscopio (Wen *et al.*, 2009, 2013). Este trabajo aporta información sobre los diferentes tipos de colonias, su coexistencia y variaciones cuantitativas de *L. innocua* en medio bifásico conservado a las temperaturas variables que ocurren en el medio ambiente de un laboratorio.

Para estudios de sobrevivencia a largo plazo en *E. coli* se han descrito 2 aislamientos conservados en medio líquido a 37 °C seguido de resiembras en medio sólido (Finkel y Kolter, 1999). En tanto que para *S. pyogenes*, los estudios de sobrevivencia a 37 °C han empleado de 1 a 4 aislamientos en medios líquidos seguido de resiembra en medio sólido (Wood *et al.*, 2005, 2009). Si bien el número de aislamientos de *L. innocua* fue solo de 30, a la par de este trabajo se investigaron 64 aislamientos de *L. monocytogenes* cuyos resultados se publicarán en otro artículo. A partir de esta experiencia, es factible que en el futuro se investigue la dinámica de otros aislamientos de *L. innocua* y otras especies de *Listeria* que conforman la colección (cepario) de aislamientos de queserías así como los obtenidos de diversos alimentos.

El presente trabajo puede ser uno de los primeros que se realizan en *Listeria* observando y contando colonias a simple vista directamente en medio bifásico sometido a las variaciones de la temperatura ambiente. Esta es una metodología que puede ser de interés para otros investigadores.

Los datos sobre tiempos de generación registrados en este trabajo pueden ser empleados para estimar los tiempos de generación de *Listeria* cuando el microorganismo está sujeto a las variaciones de la temperatura ambiente.

Verificando previamente que las cepas de *L. innocua* no porten genes de patogenicidad (lo cual puede hacerse mediante pruebas de hemólisis y CAMP), los procedimientos y resultados descritos en este trabajo pueden servir de modelo educativo para la comprensión de la etapa denominada fase de sobrevivencia largo plazo dentro del ciclo de vida bacteriano (Finkel 2006), así como para la in-

vestigación de diversidad genética, sobrevivencia de poblaciones en condiciones de escasez de nutrientes y estudios de persistencia de cepas relacionadas con resistencia a antimicrobianos o desinfectantes.

## Conclusiones

Durante la sobrevivencia a largo plazo en un medio bifásico, *L. innocua* presenta actividad a nivel de colonias consistente en surgimiento, aumento, disminución y desaparición de colonias con diferentes morfologías, o bien, un incremento en la densidad de biomasa de algunas colonias.

Es conveniente continuar investigando el comportamiento de *Listeria* conservada en medio bifásico para explicar la ocurrencia de morfologías diversas, crecimientos asincrónicos, así como la influencia del pH y la temperatura en la sobrevivencia a largo plazo de estos microorganismos.

## Literatura citada

- Arguedas-Villa C., R. Stephan y T. Tasara. (2010). Evaluation of cold growth and related gene transcription responses associated with *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Food Microbiology*, 27(5), 653–660. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.02.009>
- Ben-Jacob E., I. Cohen y H. Levine. (2000). Cooperative self-organization of microorganisms. *Advances in Physics*, 49(4), 395–554. <https://doi.org/10.1080/000187300405228>
- Ben-Jacob E., y H. Levine. (2006). Self-engineering capabilities of bacteria. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(6), 197–214. <https://doi.org/10.1098/rsif.2005.0089>
- Boyer R.R., K. Matak, S.S. Sumner, B. Meadows, R.C. Williams, J.D. Eifert y W. Birbari. (2009). Survival of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and lactic acid bacteria in chill brines. *Journal of Food Science*, 74(5), M219–M223. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01182.x>
- Celis de la Rosa, A. J. (2008). *Bioestadística*. (2da Edición). El Manual Moderno, Distrito Federal, México. 353 pp.
- Clayton E.M., K.M. Daly, C.M. Guinane, C. Hill, P.D. Cotter y P.R. Ross. (2014). Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3. *BMC Microbiology*, 14, 58 <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-58>
- Datta A. y L. Burall. (2018). Current trends in foodborne human listeriosis. *Food Safety (Tokyo, Japan)*, 6(1), 1–6. [https://doi.org/10.14252/foodsafetyfsej.201702\\_0](https://doi.org/10.14252/foodsafetyfsej.201702_0)
- Duh Y.H. y D.W. Schaffner. (1993). Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 56(3), 205–210. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.3.205>
- Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Lechería para América Latina (ERFCL). (1981). *Manual de higiene y manejo de la leche*. FAO. Santiago de Chile. 156 pp.
- Favaro M., Sarmati L., Sancesario G. y Fontana C. (2014). *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept. *JMM Case Reports*, 1(2), e003103. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.003103>
- Fentahun T. y A. Fresebehat. (2012). Listeriosis in small ruminants: a review. *Advances in Biological Research*, 6(6), 202–209. [https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2012.6.6.6615\\_9](https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2012.6.6.6615_9)
- Finkel S.E. y R. Kolter. (1999). Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 4023–4027. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4023>
- Finkel S.E. y R. Kolter. (2001). DNA as a nutrient: Novel role for bacterial competence gene homologs. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6288–6293. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6288-6293.2001>
- Finkel S.E. (2006). Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 113–120. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1340>
- Glaser P., C. Rusniok y C. Buchrieser. (2007). *Listeria* Genomics. pp. 33- 62. In: Goldfine H. y H. Shen (Eds.), *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. Springer New York, USA. 287 pp.
- Girardin H., C.E. Morris, C. Albagnac, N. Dreux, C. Glaux y C. Nguyen-The. (2005). Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.04.003>
- Gray, M.L. (1954). *Listeria monocytogenes* : a review and colonial dissociation (Tesis de doctorado). Michigan State University. <https://d.lib.msu.edu/etd/5219>
- Halebian S., B. Harris, S. M. Finegold y R. D. Rolfe. (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(3), 444–448. <https://doi.org/10.1128/jcm.13.3.444-448.1981>

- Herbert K.C. y S.J. Foster. (2001). Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel components. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 8), 2275–2284. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-8-2275>
- Hingston P.A., L. Truelstrup Hansen, J.F. Pombert y S. Wang. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* enhanced cold-tolerance variants isolated during prolonged cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, 306(2019), 108262. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2019.108262>
- Hitchins A.D., K. Jinneman, y Y. Chen. (2022). Chapter 10. pp. 10.1 – 10.20. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. En: United States Food and Drug Administration, Division of Microbiology, Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Bacterial Analytical Manual for Foods (BAM) 2022 on line edition*. United States Food and Drug Administration. Maryland, USA [publicación en línea], disponible desde Internet en <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam> [07 de enero de 2023]
- Instituto de Astronomía y Meteorología de la Universidad de Guadalajara. [IAM/UDG]. (7 de julio de 2021). Temperaturas mensuales en Guadalajara, Jalisco, México, período enero de 2000 a junio de 2021. *xlsx (archivo de Excel)*. IAM/UDG.
- Jarvis N.A., C.A. O'Bryan, S.C. Rieke, M.G. Johnson y P.G. Crandall. (2016). A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 66(2016), 256–269. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.020>
- Johnson LR. (2008). Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 251(1), 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.10.039>
- Kaszoni-Rückerl I., A. Mustedanagic, S. Muri-Klinger, K. Brugger, K.H. Wagner, M. Wagner y B. Stessl. (2020). Predominance of distinct *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in recurrent contamination events at dairy processing facilities. *Microorganisms*, 8(2), 234. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020234>
- Le Marc Y., V. Huchet, C. M. Bourgeois, J. P. Guyonnet, P. Mafart y D. Thuault. (2002) Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 219–237. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00640-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00640-7)
- MacDonald F. y A.D. Sutherland. (1994). Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *List. innocua* in two *Listeria* enrichment broths. *The Journal of Dairy Research*, 61(3), 433–436. <https://doi.org/10.1017/s0022029900030879>
- McLauchlin J. y C. Rees. (2009). Genus I. *Listeria* Pirie 1940a, 383, pp. 244–268. En de Vos P., Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K.H. y Whitman WB, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. Three: The Firmicutes*. (2nd edition)., Springer. New York, USA. 1476 pp.
- Maier R.M. (2009). Bacterial growth. pp 38–54. En: Mayer R.T., I.L. Pepper y Ch. P. Gerva, *Environmental Microbiology* (2nd edition). Academic Press, London UK. 598 pp.
- Milillo S.R., E.C. Friedly, J.C. Saldivar, A. Muthaiyan, C. O'Bryan, P.G. Crandall, M.G. Johnson y S.C. Rieke. (2012). A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 712–725. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507909>
- Moura A, O. Disson, M. Lavina, P. Thouvenot, L. Huang, A. Leclercq, M. Fredriksson-Ahomaa, A.K. Eshwar, R. Stephan y M. Lecuit. (2019). Atypical hemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 87(4), e00758-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00758-18>
- Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. 3a edición. OMS, Ginebra, Suiza. 223 pp. [publicación en línea], disponible desde Internet en <https://www.who.int/es/publications/i/item/9241546506>. ISBN 92 4 354650 3 [09 de octubre de 2022]

- Orsi R.H. y M. Wiedmann. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273–5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
- Perrin M., M. Bemer y C. Delamare. (2003). Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5308–5309. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5308-5309.2003>
- Petran R.L., y K. Swanson. (1993). Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 56(7), 616–618. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.7.616>
- Proctor R.A., A. Kriegeskorte, B.C. Kahl, K. Becker, B. Löffler y G. Peters. (2014). *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, article 99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00099>
- Ratib N.R., F. Seidl, I.M. Ehrenreich, y S.E. Finkel. (2021). Evolution in long-term stationary-phase batch culture: Emergence of divergent *Escherichia coli* lineages over 1,200 days. *mBio*, 12(1), e03337-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03337-20>
- Rebuffo-Scheer C.A., J. Dietrich, M. Wenning y S. Scherer. (2008). Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(6), 1629–1635. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1834-1>
- Riedel T.E., W.M. Berelson, K.H. Nealson y S.E. Finkel. (2013). Oxygen consumption rates of bacteria under nutrient-limited conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4921–4931. <https://doi.org/10.1128/AEM.00756-13>
- Rocha P.R., A. Dalmaso, C. Grattarola, C. Casalone, F. Del Piero, M.T. Bottero y M.T. Capucchio. (2013). Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.017>
- Rocha P.R., A. Dalmaso, C. Grattarola, C. Casalone, F. Del Piero, M.T. Bottero y M.T. Capucchio. (2013). Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.017>
- Roe J., R. deForest. y S. Jamshidi. (2018). *Mathematics for sustainability*. Springer, New York, USA. 523 pp.
- Rosas-Barbosa B.T., A. Luis-Juan Morales, R. Alaniz-de la O, A. Ramírez-Álvarez, J.P. Soltero-Ramos, R. de la Mora-Quiroz, P. Martín y C. Jacquet. (2014). Presencia y persistencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales de Jalisco, México. *e-CUCBA*, 2, 3-37. <https://doi.org/10.32870/e-cucba.v0i0.13>
- Sauders B.D. y M. Wiedmann. (2007). Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. pp. 21–53 En: Ryser E. y E.H. Marth, *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. CRC Press, Boca Ratón, USA. 896 pp.
- Seeliger H.P. (1981). Apathogene listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977) [Nonpathogenic *Listeriae*: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977) (author's transl)]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie = International Journal of Microbiology and Hygiene. A, Medical Microbiology, Infectious and Parasitology*, 249(4), 487–493.
- Shamloo E., H. Hosseini, Z. Abdi Moghadam, M. Halberg Larsen, A. Haslberger y M. Alebouyeh. (2018). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(4), 241–254.
- Verheyen D., X.M. Xu, M. Govaert, M. Baka, T. Skåra, y J.F. Van Impe. (2019). Food microstructure and fat content affect growth morphology, growth kinetics, and preferred phase for cell growth of *Listeria monocytogenes* in fish-based model systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(16), e00707-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00707-19>

- Wen J., R.C. Anantheswaran y S.J. Knabel. (2009). Changes in barotolerance, thermotolerance, and cellular morphology throughout the life cycle of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1581–1588. <https://doi.org/10.1128/AEM.01942-08>
- Wen J., X. Deng, Z. Li, E.G. Dudley, R.C. Anantheswaran, S.J. Knabel, y W. Zhang. (2011). Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* during the transition to the long-term-survival phase. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 5966–5972. <https://doi.org/10.1128/AEM.00596-11>
- Wen J., S. Karthikeyan, J. Hawkins, R.C. Anantheswaran y S.J. Knabel. (2013). *Listeria monocytogenes* responds to cell density as it transitions to the long-term-survival phase. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.014>
- Westphal L. L., J. Lau, Z. Negro, I. J. Moreno, W. Ismail Mohammed, H. Lee, H. Tang, S. E. Finkel y K.E Kram. (2018). Adaptation of *Escherichia coli* to long-term batch culture in various rich media. *Research in Microbiology*, 169(3), 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.01.003>
- Wood D.N., M.A. Chaussee, M.S. Chaussee y B.A. Buttaró. (2005). Persistence of *Streptococcus pyogenes* in stationary-phase cultures. *Journal of Bacteriology*, 187(10), 3319–3328. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3319-3328.2005>
- Wood D. N., K. E. Weinstein, A. Podbielski, B. Kreikemeyer, J. P. Gaughan, S. Valentine y B. A. Buttaró. (2009). Generation of metabolically diverse strains of *Streptococcus pyogenes* during survival in stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 191(20), 6242–6252. <https://doi.org/10.1128/JB.00440-09>
- Zinser E. R. y R. Kolter. (1999). Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 181(18), 5800–5807. <https://doi.org/10.1128/JB.181.18.5800-5807.1999>