



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
ESCUELA SUPERIOR DE APAN
LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DEL FRÍO**

TESIS DE LICENCIATURA

**PRESENCIA DE BACTERIAS PSICRÓFILAS EN EL
INTERIOR DE HUEVOS PARA PLATO DE LA
CIUDAD DE TULANCINGO, HIDALGO.**

**Para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en
Tecnología del Frío**

PRESENTA

César Jared González Cruz

Director

Dr. José Esteban Aparicio Burgos

Codirector

Dr, Adrian Zaragoza Bastida

Chimalpa, Tlalayote, Apan Hgo., septiembre del 2024

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

ESCUELA SUPERIOR DE APAN

**LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DEL
FRÍO**

TESIS DE LICENCIATURA

**PRESENCIA DE BACTERIAS PSICRÓFILAS
EN EL INTERIOR DE HUEVOS PARA PLATO
DE LA CIUDAD DE TULANCINGO,
HIDALGO.**

**Para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en
Tecnología del Frío**

PRESENTA

César Jared González Cruz

Director

Dr. José Esteban Aparicio Burgos

Codirector

Dr. Adrian Zaragoza Bastida

Comité tutorial

M. en C. Wendy M. Delgadillo Ávila

Dra. Nallely Rivero Pérez

M. en C. Rosa Mareyli Gayosso San Juan



Chimalpa, Tlalayote, Apan Hgo., septiembre del 2024



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Escuela Superior de Apan
Campus Apan

28 de agosto de 2024, Apan, Hidalgo, México.

Autorización de impresión de Tesis

Dr. Julio Valle Hernández
Coordinador de Licenciatura en Ingeniería en Tecnología del Frío

Presente

Primeramente, permítame saludarle e informarle que de acuerdo a: **La ley orgánica de la Universidad** en su Título primero: Capítulo II artículo 3 y fracciones I, II, III; del Estatuto General Título primero: Capítulo I artículo 2 fracciones II, XIV; Capítulo II artículo 4; Capítulo III artículo 9. Titulo quinto: Capítulo II artículo 114 fracción IX; Capítulo V artículo 137 fracción V; además del **Reglamento de Titulación** en su Título cuarto y Capítulo I artículo 36, artículo 37, artículo 38, artículo 39, artículo 40 y artículo 41, los abajo firmantes, integrantes del jurado para el examen recepcional del trabajo titulado:

Presencia de bacterias psicrófilas en el interior de huevos para plato de la ciudad de Tulancingo, Hidalgo.

Realizado por el estudiante: **César Jared González Cruz**

Una vez revisado el trabajo y atendidas las recomendaciones por el sustentante, tiene a bien emitir su voto favorable para la impresión de la tesis.

Nombramiento	Nombre	Firma
Presidente.	Dra. Nallely Rivero Pérez	
Secretario.	M. en C. Wendy Montserrat Delgadillo Ávila	
Primer Vocal.	Dr. José Esteban Aparicio Burgos	
Segundo Vocal.	Dr. Adrián Zaragoza Bastida	
Tercer Vocal.	M. en C. Rosa M. Gayosso San Juan	

Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 5800, 5801
esap@uaeh.edu.mx



DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón esta tesis a mi madre, Juana Inés Cruz Vite, con amor y gratitud. Tu apoyo incondicional, paciencia y sacrificio han sido mi mayor fuente de inspiración a lo largo de este viaje académico. Este logro es tan tuyo como mío, porque sin tu aliento constante y tu fe en mí, nada de esto habría sido posible. Gracias por ser mi guía, mi fortaleza y mi mayor motivación. Tu amor y dedicación han sido el pilar fundamental sobre el que he construido mis sueños. Esta tesis es un reflejo de tus enseñanzas y de todo lo que has hecho por mí.

A mi abuela, Ceferina Vite Ángeles con todo mi amor y admiración. Tu sabiduría y fortaleza han sido faros de luz en mi vida. Has sido un pilar de apoyo y una fuente constante de inspiración, animándome a seguir adelante y a superar los desafíos. Esta tesis lleva consigo un pedazo de tu amor y de las lecciones que me has impartido a lo largo de los años. Tu amor y tus consejos han sido fundamentales en mi vida y en mi camino académico. Este logro es un tributo a todo lo que has hecho por mí.

A mi familia, que me ha dado el amor y el respaldo incondicional que necesitaba para alcanzar esta meta, que han compartido conmigo tanto los desafíos como los momentos de alegría.

A mis amigos, su apoyo constante, comprensión y palabras de aliento han sido fundamentales a lo largo de este viaje. Gracias por estar siempre a mi lado, celebrando mis logros y brindándome fuerza en los momentos de duda.

Cada uno de ustedes ha jugado un papel especial en mi vida y en este proyecto, y no puedo estar más agradecido por tenerlos a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por haberme formado en sus aulas y laboratorios.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. José Esteban Aparicio Burgos, mi asesor de tesis, por su invaluable amistad, orientación y apoyo durante el desarrollo de este proyecto. Su experiencia, paciencia y compromiso han sido fundamentales para la culminación de esta investigación. Agradezco profundamente el tiempo y el esfuerzo que ha invertido en mi formación académica. Su dedicación y profesionalismo han sido una influencia positiva y significativa en mi desarrollo como investigador.

Este logro es también un testimonio de su excepcional labor como mentor. Estoy inmensamente agradecido por su apoyo continuo y por haber compartido su conocimiento y experiencia conmigo.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis coasesores de tesis, el Dr. Adrian Zaragoza Bastida y la Dra. Nallely Rivero Pérez, por su invaluable apoyo y orientación a lo largo de este proyecto. Su experiencia y conocimiento han sido esenciales para el desarrollo y la culminación de esta investigación.

A la M. en C. Rosa Mareyli Gayosso San Juan, por haberme permitido ser parte de su trabajo de investigación del cual nació este proyecto, por su amistad y consejos que me ha brindado en todo este tiempo.

A todos ellos, gracias.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE ECUACIONES	iv
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. Planteamiento del problema	4
2.1. Preguntas de investigación	6
2.2. Hipótesis	7
2.3. Objetivo General	8
2.3.1. Objetivos Específicos	8
2.4. Justificación	9
2.5. Viabilidad	9
III. Marco teórico	10
3.1. Calidad del huevo para plato	10
3.2. Defensa física del huevo ante la presencia microbiónológica	11
3.3. Defensas químicas del huevo para plato	12
3.4. Las bacterias psicrófilas	14
3.5. Curva de crecimiento	14
3.6. Contaminación microbiónológica en el interior de huevos para plato	14
3.7. Contaminación del huevo con bacterias psicrófilas	17
3.8. Estrategias de supervivencia de las bacterias psicrotróficas	17
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1. Obtención del material biológico	19
4.2. Determinación de la morfología bacteriana	20
4.3. Preparación de las bacterias y medición en el espectrofotómetro	21
4.4. Determinación de las curvas de crecimiento	22
4.5. Cálculo de la velocidad de crecimiento de las bacterias aisladas del interior del huevo	22
4.6. Cálculo del tiempo de generación de las bacterias aisladas del interior del huevo	23
4.7. Análisis estadísticos	23
V. RESULTADOS	25
5.1. Descripción morfológica de las diez cepas bacterianas	25
5.2. Determinación de las curvas de crecimiento	25
5.3. Cálculo del tiempo de generación de las bacterias aisladas del interior del huevo	29
VI. DISCUSIÓN	31

VII. CONCLUSIONES	34
VIII. ANEXOS	35
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de la chalaza (Ehlers, 2021).....	12
Figura 2. Tinción de Gram realizada para verificar la pureza de las cepas, correspondiente a <i>Lactococcus lactis</i>	19
Figura 3. Tinción de Gram realizada para verificar la pureza de las cepas, correspondiente a <i>Staphylococcus chromogenes</i>	19
Figura 4. Estriado utilizado para su descripción morfológica correspondiente a <i>Staphylococcus chromogenes</i>	19
Figura 5. Criterios de diferenciación morfológica (Morfología colonial, 2021)	20
Figura 6. Carga de muestra en placa de 96 pozos.....	21
Figura 7. Curva de crecimiento a 36°C de cinco cepas bacterianas del grupo 1 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.....	24
Figura 8. Curva de crecimiento a 15 °C de cinco cepas bacterianas del grupo 1 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.....	24
Figura 9. Curva de crecimiento a 4°C de cinco cepas bacterianas del grupo 1 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.....	25
Figura 10. Curva de crecimiento a 35°C de cinco cepas bacterianas del grupo 2 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.....	26
Figura 11. Curva de crecimiento a 15°C de cinco cepas bacterianas del grupo 2 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.....	26
Figura 12. Curva de crecimiento a 4°C de las 5 cepas bacterianas del grupo 2 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias seleccionadas con su clasificación por Gram.....	18
Tabla 2. Descripción morfológica de las 10 cepas.....	23
Tabla 3. Tiempo de generación calculada en minutos para cada bacteria analizada	28

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación utilizada para calcular la tasa de crecimiento, (Monod, 1949).....	21
Ecuación 2. Transformación de la Ecuación 1 a partir de la ley de Lambert-Beer	22
Ecuación 3. Ecuación utilizada para el cálculo de tiempo de generación, (Monod, 1949).	22

RESUMEN

Los huevos comerciales son vulnerables a la contaminación por microorganismos comensales y patógenos, que representa un desafío significativo para la seguridad alimentaria y la salud pública mexicana. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura de incubación en la curva del crecimiento de 10 cepas bacterianas provenientes de huevos comerciales del municipio de Tulancingo Hidalgo, para determinar su capacidad adaptativa. Se determinó que la mayoría de estos aislamientos tienen una clasificación Gram positiva y no presentaron pigmentación, son de consistencias suaves y mucoides y con bordes enteros. En cuanto, a las pruebas fisiológicas de crecimiento a bajas temperaturas a 4°C y 15°C, de las 10 cepas probadas solo una creció a 4°C y seis cepas crecieron a 15°C. *Proteus mirabilis* destacó por tener un crecimiento exponencial a las 6 horas de incubación y con un tiempo de generación de 21 minutos a una temperatura de 4°C. Con estos datos, se puede clasificar como una bacteria psicrófila. La fácil adaptación de crecimiento a las bajas temperaturas de bacterias estiadadas representa un riesgo sanitario importante para los consumidores de Tulancingo, Hgo.

Palabras clave: Huevos, Bacteria, Gram negativa, Psicrófilas, *Proteus mirabilis*.

SUMMARY

Commercial eggs are vulnerable to contamination by commensal and pathogenic microorganisms, which represents a significant challenge for food safety and Mexican public health. In the present study, a morphological description of the colonies and a physiological characterization were carried out in 10 strains isolated from the interior of commercial eggs from Tulancingo City, Hgo. It was found that most of these isolates have a Gram-positive classification and did not present pigmentation, are of soft and mucoid consistency and with entire edges. Regarding the physiological tests of growth at low temperatures at 4°C and 15°C, of the 10 strains tested only one grew at 4°C and six strains grew at 15°C. The *Proteus mirabilis* bacterium stands out for having a high growth at 6 hours of incubation and with a generation time of 21 minutes at a temperature of 4°C. With these data, it can be classified as a psychrophilic bacterium. The easy adaptation of zoonotic bacteria to low temperatures represents a significant health risk for consumers in Tulancingo, Hgo.

Key words: Eggs, Bacteria, Gram negative, Psychrophilic, *Proteus mirabilis*.

I. INTRODUCCIÓN

El huevo para plato es un alimento que ha cobrado suma importancia en los últimos años. Según los datos de la FAO, a nivel mundial ha tenido un aumento significativo en cuanto a las toneladas de producción, en 2022 la producción mundial de este bien fue de un aproximado de 1,652,287,528 toneladas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2022). Siendo los principales países productores: China, Indonesia, India, Estados Unidos de América, Brasil, México, Federación de Rusia, Japón y Pakistán.

En el panorama nacional, en el 2023 y según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) se produjeron 3,171,783.599 toneladas de huevo para plato, donde el principal estado productor fue Jalisco con 1,715,937.603 toneladas (SIAP, 2023). Según los datos de la misma estancia, el estado de Hidalgo produjo en el 2023 un total de 6,601.095 toneladas, donde el principal municipio productor fue Tulancingo de Bravo, con 1,397.220 toneladas (SIAP, 2023).

El huevo para plato es una fuente rica de nutrientes, como: proteínas, vitaminas, hierro y otros minerales, pero tiene una alta actividad de agua y que lo convierte en un producto alimenticio altamente perecedero (Li et al., 2017). Además, el huevo es uno de los alimentos incluidos en la canasta básica y de la dieta mexicana, debido a su consumo anual per cápita de 24 kg, lo que posiciona al país como líder global en el consumo de esta proteína de origen animal (UNA, 2023). En cuanto, a la producción a nivel nacional según el SIAP en el año 2023, se produjeron 3 millones 172 mil toneladas (SIAP, 2023).

Debido a la alta producción y demanda en el consumo de este producto, se requiere garantizar la calidad en la cadena de producción y suministro del huevo. Por lo que en México existe una Norma Oficial Mexicana que estable los estándares para el recuento total de bacterias mesófilas, de coliformes totales y para *Salmonella* (NOM-159-SSA1-2016).

A pesar de la existencia de la Norma Oficial Mexicana, gran parte de la población desconoce el manejo adecuado del huevo y de los métodos para su conservación (Preciado-Cortés Roxana, 2015). Al respecto algunos autores recomiendan realizar una limpieza y

desinfección con compuestos químicos para disminuir la posible carga microbiana del cascarón (Olse et al., 2017; Clímaco et al., 2018; Melo et al., 2019).

Varios estudios describen la presencia de bacterias de los géneros: *Escherichia*, *Staphylococcus* y *Salmonella* en la cáscara de huevos (Sander et al., 2003). La presencia *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en el interior de los huevos intactos y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en huevos rotos (Guard-Petter, 2001; Kang et al., 2006). Se ha demostrado que las cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonizan los tejidos del tracto reproductivo de las gallinas y de esta forma contaminan los huevos (Gast et al., 1990; Keller et al., 1995).

La calidad del huevo puede verse afectada significativamente por la temperatura de almacenamiento y el tiempo. Por ejemplo, el almacenamiento a temperatura ambiente y durante periodos de 14 a 21 días puede degradar la calidad del huevo, afectando la percepción del consumidor (Madrigal-Portilla, Salas-Durán, & Macaya-Quirós, 2023), además, la refrigeración de huevos previamente almacenados a temperatura ambiente podría favorecer la penetración de *Salmonella* Enteritidis a través de la cáscara (Bravo Arredondo, 2011).

Por otro lado, las bacterias patógenas y comensales pueden contaminar los huevos comerciales en cualquier etapa de la cadena de producción, desde la granja hasta el consumidor final (Marc et al., 2024), y algunas veces el huevo es almacenado en refrigeración (da Silva et al., 2022; Koppel et al., 2016). Esta práctica puede favorecer la contaminación y el crecimiento de las bacterias psicotrofas (Adam et al., 2010). Las cuales son muy resistentes y son capaces de soportar entornos extremadamente fríos, que de otro modo inhibirían el crecimiento de otros microorganismos del deterioro (Moyer y Morita, 2007).

La mayoría de las bacterias psicófilas halladas en los alimentos son tanto Gram negativas como Gram positivas, especies de los géneros: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* y *Micrococcus* (García et al., 1993; López et al., 2006; Zheng et al., 2022; Fisayo y Onoyinka, 2023; Al-brahim et al., 2023). En particular, se sabe que las bacterias que contaminan el huevo son: *Salmonella*, *Clostridium*, *Helicobacter* y *Staphylococcus* (Kone et al., 2013; Neira, C., Laca et al., 2017).

Sin embargo, en la literatura ha se percibe poca atención a la identificación, la descripción de las tasas de crecimiento los tiempos de generación de otras bacterias con características psicótrofas en los huevos comerciales mexicanos, para determinar su comportamiento biológico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura de incubación en la curva del crecimiento de 10 cepas bacterianas provenientes de huevos comerciales del municipio de Tulancingo Hidalgo, para determinar su capacidad adaptativa.

II. Planteamiento del problema

Los huevos comerciales son vulnerables a la contaminación por microorganismos patógenos y comensales; estos pueden causar daños graves a la salud humana y afectar la economía de los países (Contreras-Soto, M. B., et al., 2019; Godínez-Oviedo, A., et al., 2020). Los huevos y los productos derivados del huevo son una de las principales fuentes de varios brotes de salmonelosis. Como ejemplo en Europa; un estudio encontró que, los huevos fueron responsables de 1,040 de 1,508 los brotes de *Salmonella* atribuidos al consumo de huevos comerciales (European Food Safety Authority (EFSA), & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2023).

Además, entre el año 2017 y el 2020, se reportaron 656 casos confirmados y 202 casos probables de infecciones por *Salmonella enteritidis* vinculadas a huevos en 15 países de la Unión Europea (European Food Safety Authority (EFSA), & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2023). El panorama de la salmonelosis en los Estados Unidos indica que, es la segunda infección gastrointestinal notificada con mayor frecuencia y una causa importante de brotes de transmisión alimentaria.

En el 2022, se notificaron 65 967 casos de salmonelosis confirmados en el laboratorio, de los cuales 81 fueron mortales, y se tiene una tasa de 15,5 casos por cada 100 000 habitantes (European Food Safety Authority (EFSA), & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2023). Mientras tanto el comportamiento epidemiológico de *Salmonella* sp. en México según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiológica (SINAVE-DGE) de la secretaria de Salud de México, el número alcanza alrededor de 13,354 casos reportado de fiebre tifoidea (SINAVE-DGE-SSM. 2023). Además, el 6 de agosto de 2020 se detectaron dos brotes de tifosis aviar en el municipio de Zempoala y en Epazoyucan municipios del estado de Hidalgo. Estos brotes involucraron la afectación de 518 aves de traspatio que presentaban sinología clínica característica de la enfermedad y confirmados por análisis de laboratorio (SENASICA, 2020). Ante este panorama es imperante seguir realizando la vigilancia epidemiológica de la *Salmonella* sp. en alimentos y huevos comerciales.

En este contexto, en México existe una Norma Oficial Mexicana que estable los estándares para el recuento total de bacterias mesófilas aerobias (5×10^4 UFC/g), de coliformes totales (< 3 número más probable/mL) y para *Salmonella* ausencia en 25 g (NOM-159-SSA1-2016). Sin embargo, en varias tiendas de abarrotes se han encontrado un 16% de frecuencias de *Salmonella* en el cascaron del huevo (Guzmán-Gómez, G., et al., 2013).

En otras investigaciones reportaron la presencia *Salmonella* en huevos para plato en varios estados de la república mexicana (Aguilar C., et al., 2018; Martínez, A. M., et al., 2005).

Aunado a lo anterior, gran parte de la población desconoce el manejo adecuado del huevo por los consumidores, y de los métodos para su conservación (Preciado y Elton, 2015). Algunos realizan una limpieza y una desinfección para disminuir la posible carga microbiana del cascarón y prolongar su vida útil (Olse et al., 2017; Clímaco et al., 2018; Melo et al., 2019). Otra acción que se realiza para aumentar la vida de anaquel del huevo es almacenado en refrigeración, sin embargo, esta práctica puede favorecer la contaminación y el crecimiento de las bacterias psicotrofas (Adam et al., 2010; Koppel et al., 2016; da Silva et al., 2022).

Las bacterias psicotrofas son muy resistentes y son capaces de soportar entornos extremadamente fríos, entornos que inhibirían el crecimiento de otros microorganismos (Moyer and Morita, 2007). En particular, se reporta que los géneros bacterianos que contaminan el huevo son: *Bacillus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Kone et al., 2013; Neira, C., Laca et al., 2017). Algunos de esto géneros bacterianos producen toxinas psicotolerantes en el interior del huevo, y que están relacionadas con importantes enfermedades humanas (Baron et al., 2007; Pinchuk et al., 2010; Wang et al., 2017). En México, a pesar de que estos patógenos están ampliamente distribuidos, no existen registros de la presencia de otras bacterias de interés en la salud pública y en la adaptación a las bajas temperaturas.

2.1. Preguntas de investigación

La presente propuesta tiene como pregunta central:

- ¿Existe la presencia de bacterias psicrófilas en los huevos comerciales de la ciudad de Tulancingo de Bravo, Hidalgo?

La pregunta específica son las siguientes:

- ¿Cuál es el grado de adaptabilidad de las bacterias a las bajas temperaturas, que contaminan los huevos comerciales de Tulancingo de Bravo, Hidalgo?

2.2. Hipótesis

Hipótesis nula:

Las bacterias aisladas de los huevos comerciales tienen estabilidad de crecimiento a distintas temperaturas de incubación.

Hipótesis alterna:

Las bacterias aisladas de los huevos comerciales no tienen estabilidad de crecimiento a distintas temperaturas de incubación.

2.3. Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura de incubación en la curva del crecimiento de 10 cepas bacterianas provenientes de huevos comerciales del municipio de Tulancingo Hidalgo, para determinar su capacidad adaptativa.

2.3.1. Objetivos Específicos

- Realizar la curva de crecimiento correspondiente a cada bacteria a temperaturas de 4°C y 15°C.
- Calcular el tiempo de generación de las bacterias a temperaturas de 4°C y 15°C.

2.4. Justificación

Los huevos comerciales son vulnerables a la contaminación por microorganismos patógenos y representa un desafío significativo para la seguridad alimentaria y la salud pública mexicana. Las bacterias pueden contaminar los huevos comerciales en cualquier etapa de la cadena de producción, desde la granja hasta el consumidor final. Existen pocos estudios sobre la adaptabilidad bacteriana para crecer a diferentes temperaturas de almacenamiento del producto. En este estudio se realizó una cinética de crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas aisladas de huevos comerciales a temperaturas de refrigeración (4 y 15 °C), para poder obtener un indicador de la adaptabilidad de las bacterias que contaminación los huevos comerciales de Tulancingo de Bravo, Hidalgo.

2.5. Viabilidad

El estudio es viable porque se cuenta con la infraestructura, materiales, equipos y asesoría científica para cumplir en tiempo y forma con los objetivos y los resultados del proyecto. Con los resultados obtenidos del presente trabajo se demostrara la presencia de las bacterias psicrófilas en los huevos comerciales de Tulancingo Ho., y se podría poner en evidencia que el mantener los huevos en refrigeración no garantiza que se detenga el crecimiento de las bacterias y se genere la alteración en estos.

III. Marco teórico

3.1. Calidad del huevo para plato

El huevo de gallina es uno de los alimentos más importantes para la sociedad actual, consumido por la mayor parte del mundo, este conjunto de factores le ha dado a este alimento un valor económico, por lo que se ha conformado un sector industrial (Instituto de Estudios del Huevo, 2009) dedicado a la producción, almacenamiento distribución del huevo.

El gobierno mexicano ha expedido un conjunto de procedimientos y dictámenes para siempre asegurar el correcto manejo y, por tanto, asegurar su calidad. Este conjunto de procedimientos se almacena en la NOM-159-SSA1-2016. Sin embargo, la población está cada vez más preocupada por la calidad de los huevos para plato y se han realizado esfuerzos para mejorarla continuamente (Lloris, 2019). Los factores ambientales como la temperatura, la humedad, la presencia de dióxido de carbono (CO₂) y el tiempo de almacenamiento tienen una importancia primordial en el mantenimiento de la calidad del huevo tras la puesta (Samli et al., 2005).

El tiempo y la temperatura parecen ser los factores que más afectan a la calidad del albumen o a las Unidades Haugh (UH), consideradas por la industria el mejor indicativo de la frescura del huevo (Samli et al., 2005; Akyurek y Okur, 2009; Jin et al., 2011; Tabidi, 2011; Yimenu et al., 2017).

Un estudio realizado por Lloris en el 2019 ha determinado el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la calidad del huevo para plato donde evaluaron un total de 600 huevos en un periodo comprendido de 5, 9 y 14 días a temperaturas de 10, 20 y 30°C. Al finalizar la prueba obtuvieron que después de 14 días las UH disminuyeron de 86,74 a 57,35 a una temperatura de 30°C, a 20 °C la disminución fue menos notoria, de 86,74 a 68,13 UH mientras que a 10°C la disminución fue mínima (de 86,74 a 83,6 UH), por lo que se puede concluir de este estudio que la temperatura es un factor dependiente al tiempo de almacenamiento, mientras menor sea la temperatura a la que es almacenado el huevo para plato, mayor tiempo será el tiempo que aguantará sin tener reducciones en su calidad.

3.2. Defensa física del huevo ante la presencia microbiológica

Las defensas físicas naturales del huevo son la cáscara, la cutícula y dos membranas de la cáscara. La cáscara y las membranas pueden considerarse las partes que actúan como la barrera para la penetración de bacterias y contaminantes virales (Mayes & Takeballi, 1983).

La primera defensa que muestra el huevo en su morfología es la cutícula. Una vez que se forma la capa exterior, se deposita una capa de proteína sobre la superficie del cascarón, que se denomina cutícula (Szielasko, 1913). La cutícula es una cubierta importante que actúa para prevenir la contaminación bacteriana al cerrar los poros, lo que resulta en una reducción de la permeabilidad de la cáscara (Fromm, 1963). Según Fromm (1963), el lavado, la humedad, la temperatura ambiente y los cambios abruptos de temperatura influyen en la permeabilidad después de la oviposición. Una vez que se retira la cutícula, las bacterias adquieren la capacidad de cruzar la cáscara en un tiempo menor.

El segundo mecanismo que posee el huevo como defensa ante contaminación microbiana es, propiamente el cascarón. El cascarón de un huevo de gallina es otra barrera contra la penetración bacteriana. Esta parte tiene numerosos poros (aproximadamente entre 7.000-17.000) por huevo. Estos poros no se distribuyen uniformemente sobre la cáscara, pero se encuentran más en el extremo ancho del huevo que en el extremo estrecho del huevo (Sharp & Stewart, 1936; Walden, Allen & Trusell, 1956). El diámetro de los poros varía a lo largo de la cáscara. Haines y Moran (1940) encontraron que el poro tiene un diámetro de 13 μm en la parte superior y 6 μm en la parte inferior. Según North (1978), algunos poros están malformados y tienen muchas veces un diámetro similar que el de la mayoría de las bacterias invasoras, lo que permite una fácil penetración al interior del huevo.

El último mecanismo de defensa que posee el huevo para plato en su morfología son las dos membranas de la cáscara. Hay dos membranas debajo de la cáscara y se mantienen firmemente juntas, excepto en el extremo romo del huevo, donde se separan para encerrar el espacio de aire, comúnmente llamado cámara de aire. La membrana interna se encuentra inmediatamente sobre la albúmina y la membrana externa está unida al cascarón (Mayes & Takeballi, 1983). Moran y Hale (1936) encontraron que la membrana externa poseía tres capas de fibras, mientras que la membrana interna consistía en solo dos capas indistintas.

Muchos investigadores demostraron que las membranas de la cáscara del huevo eran más impenetrables para las bacterias que la cáscara (Mayes & Takeballi, 1983). Lifshitz et al. (1964) informaron que la membrana interna de la cáscara fue la más efectiva para prevenir la penetración bacteriana del contenido del huevo, la cáscara ocupó el segundo lugar y la membrana externa de la cáscara fue la menos importante. Sin embargo, Garibaldi y Stokes (1958) y Florian y Trussel (1957) demostraron que las membranas son más importantes que la cáscara misma para evitar la penetración de bacterias en el huevo. Estos autores pudieron demostrar que la velocidad de penetración de la membrana del cascarón depende del tipo de bacteria invasora. El tiempo de penetración osciló entre 1 y 4 días.

Del estudio de las defensas físicas del huevo se deduce que ninguna de ellas posee propiedades bactericidas (Mayes & Takeballi, 1983). Por esta razón, bajo ciertas condiciones, las bacterias pueden encontrar su camino hacia el contenido del huevo.

3.3. Defensas químicas del huevo para plato

Aunque la albúmina no está en contacto directo con la microbiota de la superficie exterior de la cáscara, es susceptible a contaminarse. La contaminación de la albúmina se produce

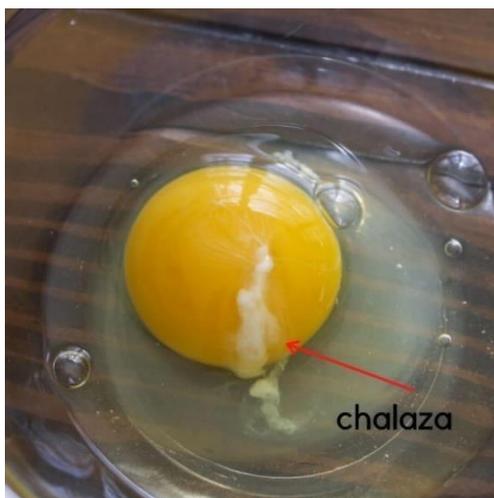


Figura 1. Fotografía de la chalaza (Ehlers, 2021).

cuando la cutícula, la cáscara y las membranas de la cáscara no logran evitar la invasión. Board (1977) informó de un mecanismo de defensa de la albúmina, la naturaleza viscosa de las proteínas que dificultan el movimiento de las bacterias a la yema, además, la organización de la chalaza en la albúmina de los huevos frescos mantiene la yema alejada de los lados de la membrana de la cáscara. Yadav y Vadehra (1977) llegaron a conclusiones similares en el sentido de que pensaban que la estructura física de las proteínas de la clara de huevo

determina su resistencia al crecimiento bacteriano, así como su aparente falta de agua y nutrientes disponibles. Los cambios durante el almacenamiento, como el adelgazamiento de

la albúmina, el debilitamiento de la chalaza y de la membrana vital, incluida la eliminación virtual de la capa externa (Sato & Kato, 1978), tenderán a contraer estas defensas.

Las sustancias químicas implicadas suelen ser compuestos naturales, aunque también se ha demostrado que los antibióticos con los que se alimenta a las gallinas se incorporan rápidamente tanto a la albúmina como a la yema de sus huevos (Anhalt, Wenzel & Conrad, 1976). De los compuestos naturales, la lisozima, la conalbúmina y el pH alcalino parecen ser de importancia primordial (Board, 1969), pero la ovomucina y el inhibidor de óvulos también pueden estar involucrados (Brendl & Klein, 1976; Osuga & Feeney, 1974).

El pH de la albúmina de un huevo de gallina inmediatamente después de la puesta suele ser de 7.6 a 7.9; que está cerca del óptimo para el crecimiento de la mayoría de los saprófitos, pero hay un aumento gradual en el valor del pH durante el almacenamiento. Este aumento se debe a la pérdida de dióxido de carbono. Después de aproximadamente 1 semana a temperatura ambiente, el pH aumenta a más de 9 (Romanoff & Romanoff, 1949). Esto va más allá del máximo tolerado por muchos microorganismos comunes. Cuando se comparó el crecimiento de bacterias en la clara de huevo a pH 9.1 – 9.3 con el crecimiento en la clara de huevo ajustado al pH del huevo en el momento de la puesta, Garibaldi (1960) encontró que varias cepas de bacterias eran incapaces de crecer o sobrevivir.

La Lisozima; Board (1969) y Geoffrey & Bailey (1975) informaron que la lisozima tiene acción lítica sobre la pared celular bacteriana. Es capaz de hidrolizar el enlace 1-4 entre la N-acetilneuramina y la N-acetilglucosamina en la pared bacteriana. Esta observación fue demostrada *in vitro*. La lisozima también puede actuar sobre algunos organismos debido a la basicidad de la molécula.

La conalbúmina, cuyas fracciones proteicas son idénticas a las de la transferrina, actúa contra la infección microbiana del huevo privando a los microorganismos de iones hierro, lo que impide su multiplicación (Donovan, Beardslee & Ross, 1976). Feeney et al. (1952) observaron diferentes grados de inhibición entre los microorganismos probados donde *Micrococcus* spp. fue más sensible que *Bacillus* spp.

3.4. Las bacterias psicrófilas

Las bacterias psicrófilas se caracterizan por tener un crecimiento a temperaturas de refrigeración, aproximadamente a 7.2 °C o menos, debido a su capacidad para crecer en temperaturas frías Witter (1961). En tanto las Psicrotróficas también conocidas como psicrófilas facultativas pueden crecer a 7°C o menos, sin importar su temperatura óptima de crecimiento.

El término psicrófilo fue una elección etimológica desafortunada, ya que las raíces implicaban una descripción tal cual fue “amar el frío”. Al año siguiente de su acuñación fue criticado por Muller (1903), quien demostró que, si bien estos organismos eran capaces de crecer a bajas temperaturas, crecían más rápido a temperaturas más elevadas que la de refrigeración. Se ha sugerido que estas bacterias podrían llamarse mejor psicrotolerantes, pero esta sugerencia y otras de naturaleza similar no ganaron aceptación por lo que el término psicrófilo ha persistido (Witter, 1961).

3.5. Curva de crecimiento

El crecimiento de las poblaciones microbianas puede medirse de diferentes maneras. Para algunos tipos de trabajo experimental la determinación de la turbidez es un método práctico para controlar el crecimiento bacteriano. El instrumento utilizado para medir la turbidez es un espectrofotómetro (o colorímetro). Cuando la cantidad de bacterias aumenta, menos luz alcanza la célula fotoeléctrica, se puede determinar como una medición logarítmica del instrumento denominada absorbancia (a veces densidad óptica o DO). La absorbancia se utiliza para graficar el crecimiento bacteriano (Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L., 2007).

El modelado matemático más usado actualmente tanto en la teoría como en la práctica es el modelo propuesto por Monod en 1949, donde toma en cuenta tanto variables de tiempo como de concentración bacteriana, dichas ecuaciones se describen más adelante.

3.6. Contaminación microbiológica en el interior de huevos para plato

Por el alto contenido en nutrientes que posee la parte interna del huevo es fácil que si existe alguna clase de contaminación bacteriana ésta pueda proliferar ampliamente, Hens

(1939) observó que el huevo está dotado de defensas físicas y químicas contra la infección microbiana, sugirió que estas defensas se han desarrollado para proteger al embrión. Se sugirió que la contaminación podría venir previo a la puesta del huevo (Mayes & Takeballi,

1983), por lo que Harry en 1953 intentó aclarar esta situación para lo cual Mataba gallinas y examinaba sus óvulos. Fue capaz de recuperar bacterias del 43% de los óvulos en los que las bacterias más comunes aisladas fueron *Lactobacillus spp.* y *Micrococcus spp.*

Una vez que la gallina ha puesto el huevo, generalmente se humedece y se ensucia al mismo tiempo. La presencia de suciedad en el entorno aumenta el número de organismos contaminantes (Board et al., 1964). Por lo que, la única vía a través de la cual las bacterias pueden entrar en la parte interior del huevo es a través de los poros. Como la cutícula está húmeda en esta etapa, es posible que se produzca una invasión microbiana de la cáscara (Board, 1977). El crecimiento de hifas de mohos facilita el agrandamiento de los poros, lo que ayuda a la entrada de bacterias en el huevo (Weston & Halnan, 1927). Algunos investigadores han reportado (Garibaldi & Stokes, 1958; Haines et al., 1940) que el cascarón del huevo de gallina es permeable a microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Diversos estudios sobre este tema se han realizado, entre los cuales se encuentran el estudio realizado por (Kraus et al., 2022), donde evaluaron cuatro genotipos de gallinas ponedoras, gallinas checas Golden Spotted, Greenleg Partridge, White Leghorn e híbridas comerciales, una vez recolectaron las muestras se dividieron en distintos grupos dependiendo el tiempo de almacenamiento (0, 14 y 28 días) y su temperatura de almacenamiento (5 y 20°C). El análisis microbiológico incluyó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Escherichia coli*, *Enterococcus* y número total de microorganismos. La contaminación significativamente más baja de cáscara de huevo de *Escherichia coli* fue en los huevos de las gallinas White Leghorn (4,42 log UFC/cáscara de huevo). En cuanto al efecto del genotipo, las gallinas Greenleg Partridge y White Leghorn presentaron huevos con estadísticamente la menor ocurrencia de bacterias *Escherichia coli* en la albúmina. Se encontraron diferencias significativas en la contaminación microbiana de la superficie del huevo entre los genotipos de gallinas observados. La penetración de los microorganismos seleccionados también fue significativa en la contaminación de las membranas de la cáscara de huevo por el número total de microorganismos y en la contaminación de la albúmina por *Escherichia coli*.

El estudio realizado por (Osowski et al., 2019) determinó la capacidad de los serotipos *Salmonella Heidelberg* y *Salmonella Typhimurium* para penetrar a través de la cáscara del huevo y detectar estas bacterias en la albúmina y la yema para *S. Heidelberg*, el porcentaje de positividad (casos positivos) fue menor tanto en albúmina como en yema a intervalos de en comparación con *S. Typhimurium*. Concluyeron que las cepas de *Salmonella* ensayadas fueron capaces de penetrar en la cáscara del huevo y multiplicarse tanto en la albúmina como en la yema y que *S. Typhimurium* demostró ser la más eficiente para crecer dentro de estas porciones del huevo.

Board, 1964 utilizó métodos bacteriológicos y químicos para seguir el curso de la infección en huevos inoculados con bacterias Gram negativas, incubados a 27°C. Encontró que las poblaciones incubadas permanecieron estáticas o disminuyeron ligeramente hasta que se produjo una nueva multiplicación entre los 12 y 30 días después de la inoculación. Donde en ese momento se produjo una infección general del contenido del huevo y se produjeron cambios significativos en el pH y la concentración de glucosa en la albúmina.

3.7. Contaminación del huevo con bacterias psicrófilas

La mayoría de las bacterias psicrófilas halladas en el huevo son: *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. (Kone et al., 2013; Neira, C., Laca et al., 2017). Algunos de estos géneros bacterianos producen toxinas psicrotolerantes en el interior del huevo, y que están relacionadas con importantes enfermedades humanas (Baron et al., 2007; Pinchuk et al., 2010; Wang et al., 2017). *Pseudomonas fluorescens* son productoras de pigmentos fluorescentes móviles y la pioverdina que producen se une a los metales en competencia con la conalbúmina (Kraft, A. A., 1992).

3.8. Estrategias de supervivencia de las bacterias psicrotróficas

Existen varias estrategias de supervivencia usadas por las bacterias psicrotróficas bajo condiciones de estrés por frío, entre las cuales destacan i) la organización estructural de la envoltura celular (para el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CFL1) y de la membrana plasmática con ácidos grasos cíclicos y poliinsaturados en los fosfolípidos de sus membranas (aumentando la fluidez de la membrana) (Schinik, 1999); ii) La producción de moléculas crioprotectoras como: azúcares, aminoácidos, polialcoholes y polímeros, y

algunos puede mantener la integridad de la membrana y en mantener la osmoprotección bacteriana (Vivanco-Calixto et al., 2016; Hubalek, et al., 2003; Cleland et al., 2004; Morales García et al., 2010); iii) Producción de polisacáridos para potenciar la tolerancia a las bajas temperaturas como lo hace la bacteria *Pseudoalteromonas* sp. SM20310 (Liu, 2013) y iv) Una disminución de los expresión de genes ligados al metabolismo energético y a la incorporación de fuentes de carbono, así como un aumento en la producción de la proteína de shock por frío producida por la bacteria *Psychrobacter arcticus* 273-4 (Kuhn, 2012). Estrategias que, no fueron evaluadas en el presente estudio, sin embargo, podrían ser la explicación del crecimiento bacteriano a bajas concentraciones de las cepas evaluadas

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Obtención del material biológico

Se eligieron 10 cepas bacterias provenientes de la parte interna del huevo previamente identificados, almacenados en la colección bacteriana del laboratorio de bacteriología de investigación, ubicado en el Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

Las bacterias seleccionadas fueron:

Bacteria	Clasificación Gram
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Staphylococcus sciuri</i>	+
<i>Bacillus circulans</i>	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+
<i>Lactococcus lactis</i>	+
<i>Staphylococcus xylosus</i>	+
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	+

Tabla 1. Bacterias seleccionadas con su clasificación por Gram.

Las cepas fueron reactivadas de la crioconservación por medio de inoculación en caldo nutritivo (marca BD, Dibico), y posteriormente se verificó su pureza por medio de la tinción de Gram.

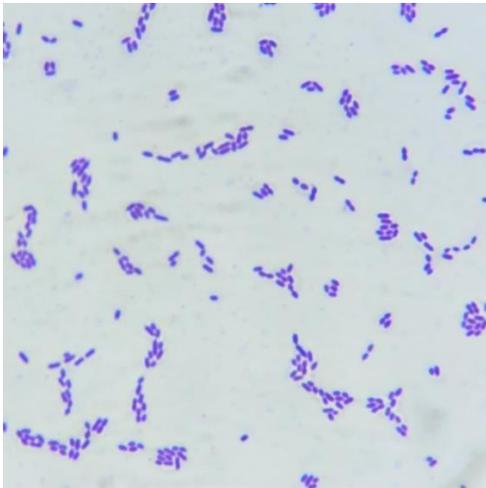


Figura 2. Tinción de Gram, correspondiente a *Lactococcus lactis*.

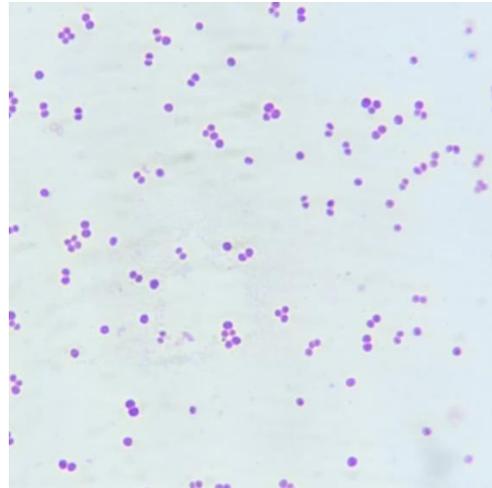


Figura 3. Tinción de Gram, correspondiente a *Staphylococcus chromogenes*.

4.2. Determinación de la morfología bacteriana

La identificación de la morfología de las cepas bacterianas se realizó siguiendo el protocolo de Aguilar-Romero *et al.*, 2014, primero se verificó la morfología a nivel macroscópico para posteriormente verificar las características morfológicas de cada estriado en caja Petri, siendo las características evaluadas:



Figura 4. Estriado utilizado para su descripción morfológica correspondiente a *Staphylococcus chromogenes*.

Forma de cada colonia, el borde de la colonia, la transparencia, el brillo, el color, la textura, su elevación y finalmente, su consistencia tal y como se describe en la siguiente figura:

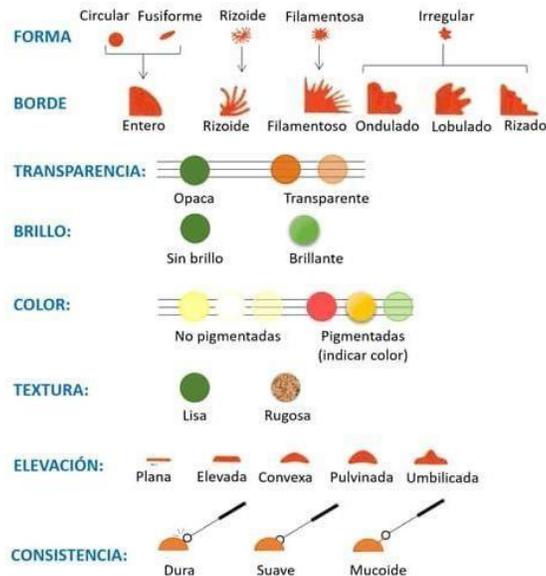


Figura 5. Criterios de diferenciación morfológica (Morfología colonial, 2021).

4.3. Preparación de las bacterias y medición en el espectrofotómetro

En este apartado se utilizó la metodología propuesta por (Myers, Curtis, & Curtis, 2013), (Katipoglu-Yazan, Dev, Desmond-Le Quéméner, & Bouchez, 2023) con modificaciones. Las muestras de bacteria fueron sembradas 48 horas previas a las mediciones; en 4.5 ml en caldo nutritivo, con 0.5 ml de bacteria. En las 24 horas previas se repitió el mismo proceso, usando ahora como material inicial la muestra preparada horas antes.

Minutos previos a la lectura se ajustó el material biológico obtenido previamente al 0.5 del patrón de turbidez de McFarland (Remel, R20421, Lenexa, USA) y posteriormente se inocularon 0.5 ml de la bacteria ajustada en 4.5 ml de caldo nutritivo. Este proceso se realizó en 9 viales, los cuales fueron divididos en 3 y asignados a las temperaturas de 4°C, 15°C y 36°C, siendo esta última temperatura de control.

De cada repetición se tomaron 0.1 ml y se vertieron en una placa de 96 pozos para su lectura, la cual se realizó en un espectrofotómetro de la marca Thermo Fisher Scientific, modelo Multiskan™ FC a una longitud de onda de 620 nanómetros para obtener la absorción

(crecimiento) de cada muestra, las lecturas se han realizado a las 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36 y 48 horas.



Figura 6. Carga de muestra en placa de 96 pozos.

4.4. Determinación de las curvas de crecimiento

Los datos obtenidos se han manejado por medio del software *Microsoft Excel*, donde se utilizó el promedio de la absorción obtenida de cada tratamiento de temperatura asignada con respecto al tiempo en horas.

4.5. Cálculo de la velocidad de crecimiento de las bacterias aisladas del interior del huevo

A partir de los datos obtenidos se calculó la tasa o velocidad de crecimiento denominada con la letra griega μ y el tiempo de generación denominado con la letra g establecidos por el modelo de Monod (Monod, 1949), para el crecimiento de cultivos bacterianos:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t_2 - t_1}$$

Ecuación 1. Ecuación utilizada para calcular la tasa de crecimiento, (Monod, 1949).

Donde N representa el número de células a un determinado tiempo y N_0 representa el número de células en un cultivo bacteriano; según lo establecido por la ley de Lambert-Beer la turbidez (absorción) es proporcional a la concentración de partículas (Acebo-González & Hernández-García, 2013), entonces $N = Abs$. t_2 corresponde al tiempo dos expresado en

minutos mientras que t_1 corresponde al tiempo uno expresado en minutos. Dando como resultado la siguiente modificación a la Ecuación 1:

$$\mu = \frac{\ln Abs_2 - \ln Abs_1}{t_2 - t_1}$$

Ecuación 2. Transformación de la Ecuación 1 a partir de la ley de Lambert-Beer.

Abs_2 corresponde a la absorción obtenida en un tiempo dos y Abs_1 corresponde a la absorción obtenida en un tiempo uno; esta expresión debe resultar en unidades de minutos⁻¹. Las variables t_2 y t_1 no sufren modificaciones.

4.6. Cálculo del tiempo de generación de las bacterias aisladas del interior del huevo

Para calcular el tiempo de generación (g) se usó la siguiente ecuación (Monod, 1949):

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Ecuación 3. Ecuación utilizada para el cálculo de tiempo de generación, (Monod, 1949).

Donde μ corresponde a la velocidad de crecimiento y las unidades resultantes deben estar expresadas en minutos.

4.7. Análisis estadísticos

Para el análisis de las curvas de crecimiento, las bacterias se dividieron en dos grupos de acuerdo con las absorbancias obtenidas, el Grupo 1: *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus sciuri*. Grupo 2: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus circulans*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus chromogenes*.

Los datos del crecimiento obtenidos por absorbancia de las cepas bacterianas fueron sometidos al análisis de varianza y en dependencia de la significancia, las medias se compararon mediante

la prueba de Friedman con el programa GraphPad Prism versión 10.0.0 para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA).

V. RESULTADOS

5.1. Descripción morfológica de las diez cepas bacterianas

Se realizó la descripción de la morfología de las diez cepas bacterianas (Tabla 1). Se observó una característica común en todas las cepas bacterianas analizadas fue en su textura lisa y color no pigmentado. La apariencia de los bordes de las colonias varía entre ondulado y entero. Las elevaciones de los aislados fueron convexa, plana y elevada y con una consistencia de suave, dura y mucoide como se describe en la siguiente tabla:

Bacteria	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación	Consistencia
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Circular	Entero	Transparente	Brillante	No pigmentada	Lisa	Convexa	Suave
<i>Escherichia coli</i>	Irregular	Ondulado	Opaca	Brillante	No pigmentada	Lisa	Plana	Mucoide
<i>Lactococcus lactis</i>	Circular	Entero	Transparente	Brillante	No pigmentada	Lisa	Convexa	Suave
<i>Serratia marcescens</i>	Circular	Entero	Opaca	Brillante	No pigmentada	Lisa	Elevada	Mucoide
<i>Bacillus licheniformis</i>	Irregular	Ondulado	Opaca	Brillante	No pigmentada	Lisa	Plana	Dura
<i>Bacillus circulans</i>	Circular	Entero	Transparente	Brillante	No pigmentada	Lisa	Plana	Dura
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Circular	Entero	Opaca	Brillante	No pigmentada	Lisa	Convexa	Mucoide
<i>Enterococcus faecalis</i>	Circular	Entero	Transparente	Sin brillo	No pigmentada	Lisa	Elevada	Suave
<i>Proteus mirabilis</i>	Circular	Entero	Transparente	Sin brillo	No pigmentada	Lisa	Plana	Suave
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Circular	Entero	Transparente	Brillante	No pigmentada	Lisa	Convexa	Suave

Tabla 2. Descripción morfológica de las 10 cepas evaluadas.

5.2. Determinación de las curvas de crecimiento

Las bacterias se dividieron en dos grupos para la realización de las presentes gráficas, teniendo como Grupo 1 a las muestras: *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus sciuri*. En el Grupo 2 se incluyeron: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus circulans*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus chromogenes*.

A continuación, se muestran las curvas de crecimiento obtenidas:

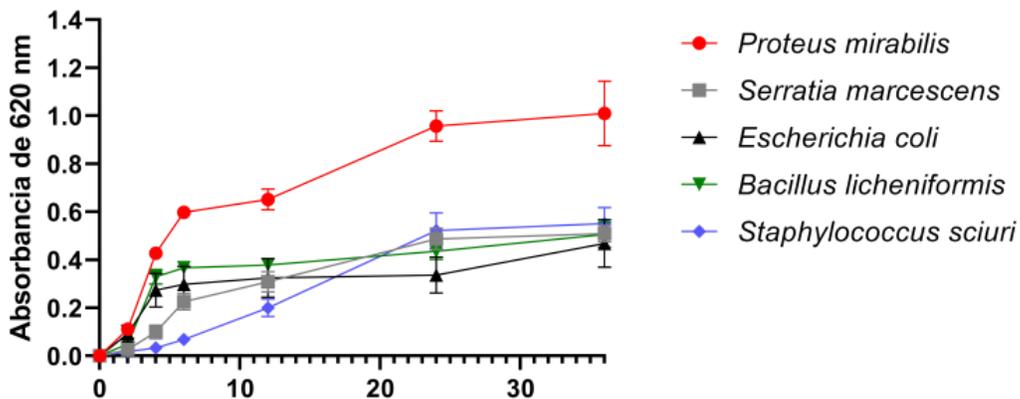


Figura 7. Curva de crecimiento a 36°C de cinco cepas bacterianas del grupo 1 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.

En la Figura 7 se observa como *Proteus mirabilis* ha sido la muestra que más se adaptó a la temperatura control (36 °C). Mientras que, *Staphylococcus sciuri* tardó más en mostrar un crecimiento a 36°C en su fase exponencial; ya que alcanzó su punto máximo de crecimiento después de las 20 horas. Finalmente, la bacteria con la adaptación más baja a esta temperatura fue *Escherichia coli*.

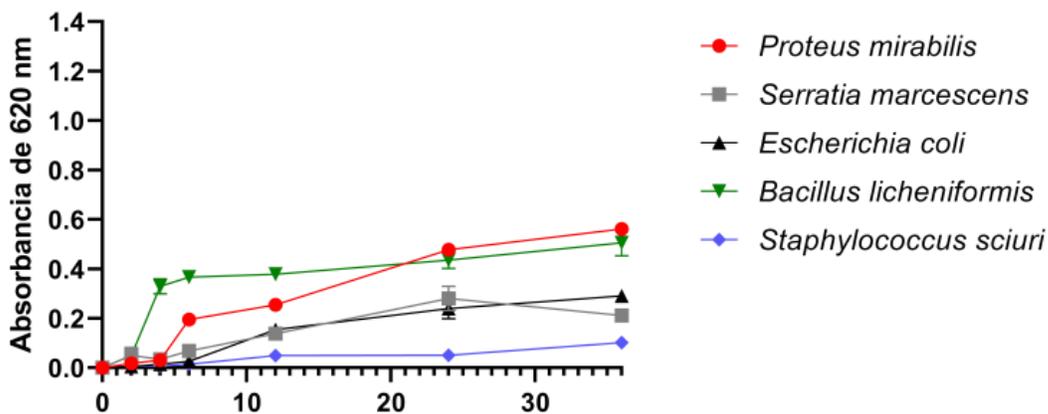


Figura 8. Curva de crecimiento a 15 °C de cinco cepas bacterianas del grupo 1 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.

En la Figura 8, se muestra como *Proteus mirabilis* se adaptó a la temperatura de 15°C, con una absorbancia cercana a 0.6 de crecimiento muy similar a *Bacillus licheniformis*. Por lo cual *Proteus mirabilis* fue la bacteria que mejor se adaptó ha mostrado en a 4°C; debido a que en menos de 5 horas alcanzó su punto máximo de crecimiento. Además, se observó que, la bacteria con la menor adaptación a esta temperatura fue *Staphylococcus sciuri* con una absorbancia menor al 0.2.

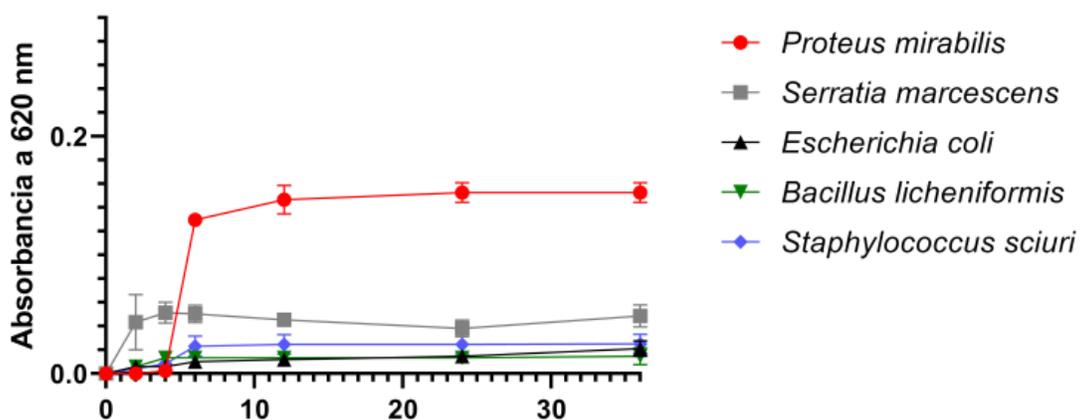


Figura 9. Curva de crecimiento a 4°C de cinco cepas bacterianas del grupo 1 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.

En la Figura 9, se observa que a 4°C *Proteus mirabilis* fue la bacteria que mejor se adaptó con diferencia estadística (P 0.014) en comparación con las otras bacterias, y mostró un crecimiento máximo en un tiempo menor a 10 horas. El resto de las bacterias han mostrado un crecimiento bastante similar.

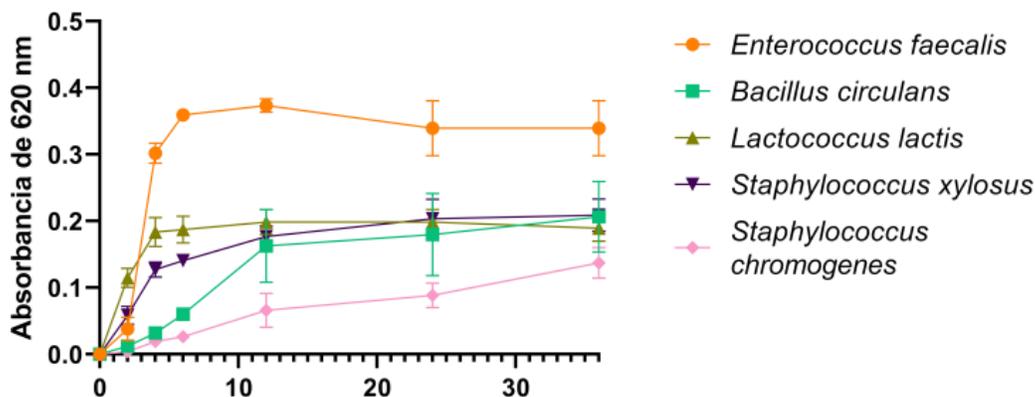


Figura 10. Curva de crecimiento a 35°C de cinco cepas bacterianas del grupo 2 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.

En la Figura 10 se muestra la curva de crecimiento correspondiente al grupo 2, donde se plasma una mejor adaptación de *Enterococcus faecalis* a la temperatura de control (36 °C). *Staphylococcus chromogenes* fue la bacteria que mostró un menor crecimiento. Además, de mostrar un periodo exponencial bastante largo. El resto de las muestras han tenido un crecimiento muy similar.

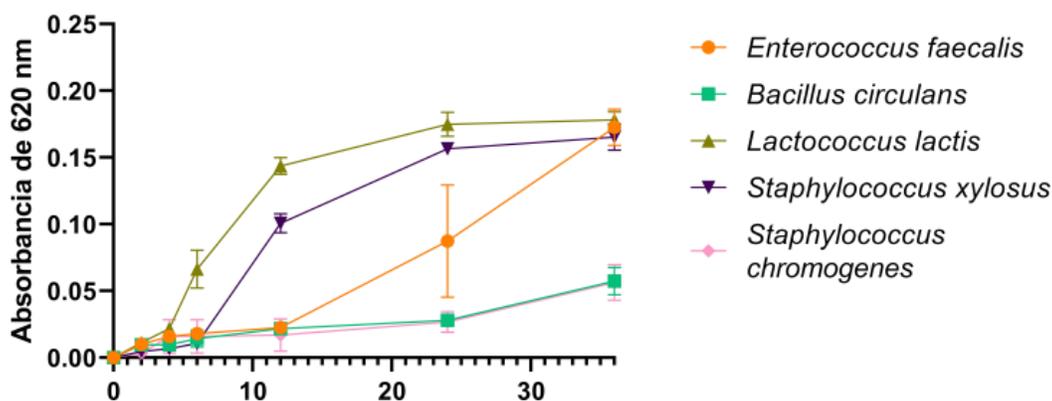


Figura 11. Curva de crecimiento a 15°C de cinco cepas bacterianas del grupo 2 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.

En la Figura 11 se muestra el crecimiento del grupo 2 a 15°C, donde se observa un crecimiento bastante bajo, donde las bacterias con una mejor respuesta de crecimiento a esta temperatura fueron: *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus xylosus* con una absorbancia muy cercana al 0.2. *Bacillus circulans* y *Staphylococcus chromogenes* han sido las bacterias con la menor adaptación, ambas con una absorción de 0.05.

Todas las bacterias del grupo 2 han mostrado un crecimiento mínimo a 4°C, muy por debajo del 0.1 de absorción (ver figura 12).

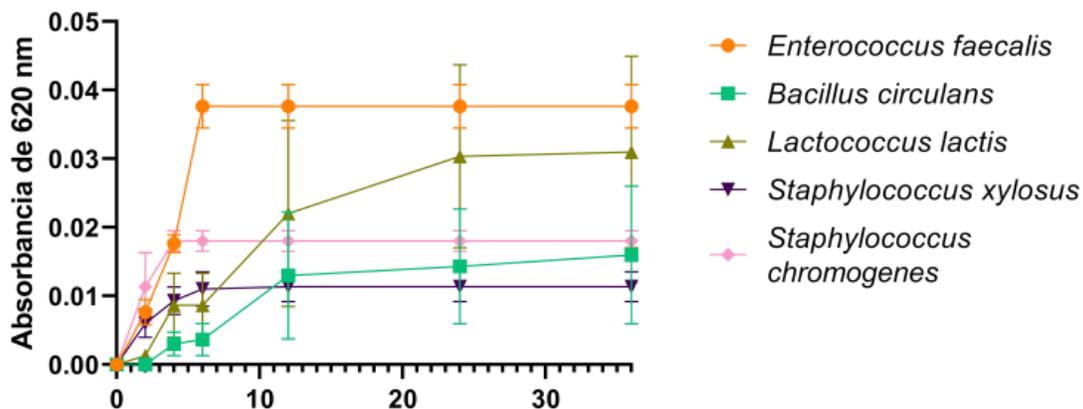


Figura 12. Curva de crecimiento a 4°C de las 5 cepas bacterianas del grupo 2 en 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media.

5.3. Cálculo del tiempo de generación de las bacterias aisladas del interior del huevo

En la siguiente tabla se muestra el tiempo de generación obtenida para cada bacteria, a cada temperatura analizada:

Bacteria	Tiempo de generación en minutos		
	4°C	15°C	36°C
<i>S. marcescens</i>	491	205	61
<i>E. coli</i>	163	86	76
<i>P. mirabilis</i>	21	45	62
<i>S. sciuri</i>	113	145	135
<i>B. circulans</i>	414	211	131
<i>B.licheniformis</i>	104	99	44
<i>E. faecalis</i>	100	177	40
<i>L. lactis</i>	268	128	177
<i>S. xylosus</i>	188	233	107
<i>S.chromogenes</i>	180	53	53

Tabla 3. Tiempo de generación calculada en minutos para cada bacteria analizada.

Respecto al tiempo de generación expresado en la Tabla 3 se observa como *Proteus mirabilis* es la bacteria que mejor se ha adaptado a 4°C, con 21 minutos, repitiendo la misma tendencia a 15°C con un tiempo de generación de 45 minutos siendo el menor tiempo registrado en este apartado, finalmente a 36°C la muestra que mejor adaptación mostró fue *Enterococcus faecalis* con un tiempo de 40 minutos.

VI. DISCUSIÓN

En el presente experimento al observar la morfología de las colonias bacterianas solo algunas presentaron pigmentación y consistencia suave y mucosa con bordes enteros. De acuerdo con Aguilar-Romero y cols., 2014, las colonias de *Staphylococcus* no muestran pigmentación y presentan forma circular. En el caso del género de *Escherichia* algunas colonias pueden presentar un color grisáceo y de consistencia mucosa (Aguilar-Romero et al., 2014). Wakita y cols., 2007 reportan que las colonias de *Bacillus* forman un anillo concéntrico y de borde irregular en el centro. En cepas de *Bacillus* aisladas en el presente experimento no se observó, el anillo concéntrico y presentaron bordes irregulares y circulares.

Las cepas evaluadas fueron capaces de crecer a 36 °C, con crecimiento abundante de *Proteus mirabilis*; *Serratia marcescens*; *Escherichia coli*; *Bacillus licheniformis*; *Enterococcus faecalis*; *Staphylococcus sciuri* (Figuras 1 y 4). Estos resultados son similares a los encontrados por Jurado y Gúzman, 2015 en su estudio, en donde observaron que la densidad máxima fue de 3.3×10^{10} UFC/mL de bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* cultivadas a 35°C a las 16 horas, y en 15 cepas de bacterias *Lactobacillus* spp. presentaron valores de 1 a 560 nm de longitud de onda (Laurencio et al., 2017).

En cuanto a las pruebas fisiológicas de crecimiento a bajas temperaturas (4 °C y 15 °C), de las diez bacterias trabajadas solo *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* crecieron a 15°C (Figuras 3 y 6) y únicamente *Proteus mirabilis* presentó crecimiento abundante a 4°C mostrando diferencias estadísticas significativas $p < 0.014$ (Figura 3).

Se sabe que *Bacillus subtilis* aislado de la rizosfera de plantas de papa puede crecer a 4°C (Calvo y Zuñiga, 2010), mientras que *Bacillus* spp., aislado de leche cruda tienen la capacidad de crecer a temperaturas de 2°C por un largo tiempo (Griffiths and Phillips, 1990). Las bacterias psicrófilas son microorganismos que tienen la capacidad de multiplicarse a

bajas temperaturas. Su temperatura óptima de crecimiento es baja, aproximadamente 15°C o inferior y pueden crecer a temperaturas de refrigeración (Moyer y Morita, 2007).

Existen varias estrategias de supervivencia usadas por las bacterias psicrotróficas bajo condiciones de estrés por frío, entre las cuales destacan i) la organización estructural de la envoltura celular (para el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie bulgaricus CFL1) y de la membrana plasmática con ácidos grasos cíclicos y poliinsaturados en los fosfolípidos de sus membranas (aumentando la fluidez de la membrana) (Schinik, 1999); ii) La producción de moléculas crioprotectoras como: azúcares, aminoácidos, polialcoholes y polímeros los cuales pueden mantener la integridad de la membrana y mantener la osmoprotección bacteriana (Vivanco-Calixto *et al.*, 2016; Hubalek, *et al.*, 2003; Cleland *et al.*, 2004; Morales-García *et al.*, 2010); iii) Producción de polisacáridos para potenciar la tolerancia a las bajas temperaturas como lo hace la bacteria *Pseudoalteromonas* sp. SM20310 (Liu, 2013) y iv) Disminución en la expresión de genes ligados al metabolismo energético y a la incorporación de fuentes de carbono, así como un incremento en la producción de la proteína de shock por frío producida por *Psychrobacter arcticus* (Kuhn, 2012).

Proteus mirabilis es un bacilo Gram negativo, zoonótico causante de infecciones urinarias y respiratorias (Rubio-Sánchez y Lepe-Balsalobre, 2022; Villamil *et al.*, 2006). Varios estudios han reportado la presencia *Proteus mirabilis* en carne de pollo de venta al público y en lesiones patológicas en tejidos de aves de engorda (Guerra *et al.*, 2023; Sánchez *et al.*, 2020; Sánchez *et al.*, 2021). La presencia de esta bacteria en el interior de los huevos comercializados no se había reportado; sin embargo se sabe que es parte de la microbiota normal, que está ampliamente distribuida en el ambiente y que tiene capacidad de adherencia a las células HEp-2 del tejido urinario (Drzewiecka, 2016; Sánchez *et al.*, 2021; Espinosa-Antúnez *et al.*, 2019). Con los argumentos antes mencionados, la bacteria fácilmente puede alcanzar la cascara y el interior del huevo o por causa de un mal manejo del producto pueda ingresar al interior y contaminarlo. Además, la adaptación que tiene la bacteria a las bajas temperaturas representa un desafío más para la comunidad científica mundial.

El tiempo de generación en bacterias se refiere al tiempo que una célula bacteriana necesita para dividirse en dos por división binaria (Baer y Keady, 2021). En condiciones ideales de temperatura y medios de cultivos, algunas bacterias pueden duplicarse rápidamente, mientras que otras requieren más tiempo. Las bacterias mesófitas como: *E. coli* tiene un tiempo de generación de 20 minutos y en *Staphylococcus aureus*, necesita 30 minutos para duplicarse (Zu y Lebek, 1980; Belay y Rasooly, 2002). En contraste, con los resultados de nuestro estudio, en donde se observó que promedio en el tiempo de generación de las diez bacterias analizadas fue de 89 minutos a 36°, incluso la cepa de *E. coli* necesito 76 minutos y la bacteria que presento una menor *g* fue *Bacillus licheniformis* con 44 minutos (Tabla 2).

Se observó, también una tendencia en el aumento del tiempo de generación de 138 minutos a 204 minutos en la mayoría de las bacterias crecidas a 15°C y a 4°C (Tabla 2). *Proteus mirabilis* tiene un tiempo de generación aún más corto, de 21 minutos a 4°C en comparación con todas las bacterias analizadas. En este contexto, la bacteria del hielo marino del Ártico *Psychromonas ingrahamii* ha demostrado tener la temperatura de crecimiento más baja, de 240 horas a -20 °C (Breezee y Staley, 2004). El crecimiento bacteriano no es infinito ni constante debido a diversas variables, como especies, temperatura, pH y nutrientes disponibles, y el tiempo de generación es crucial para comprender cómo las bacterias se multiplican y se adaptan a cualquier entorno.

VII. CONCLUSIONES

Las bacterias evaluadas presentaron diferencias en la adaptación a las diferentes temperaturas evaluadas. Las bacterias evaluadas muestran un estado de latencia al ser sometidas a 4°C, sin embargo, *Proteus mirabillis* fue la más adaptada con un tiempo de generación de 21 minutos a una temperatura de 4°C. Lo anterior pone en evidencia que el mantener los huevos en refrigeración (4°C) no garantiza que se detenga el crecimiento de las bacterias y generen alteraciones en este.

VIII. ANEXOS

A continuación, se anexa el artículo aceptado para su publicación en la revista Padi perteneciente a la UAEH.

Presencia de bacterias psicrófilas en huevos comercializados en Tulancingo, Hidalgo

Presence of psychrophilic bacteria in eggs sold in Tulancingo, Hidalgo

Cesar J. González-Cruz ^a, José E. Aparicio Burgos ^a, Nallely Rivero Pérez ^b, Rosa M. Gayosso San Juan ^b, Wendy M. Delgadillo Ávila ^a, Adrian Zaragoza Bastida ^b

^a Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 43900, Apan, Hidalgo, México.

^b Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 43660, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

Resumen

Los huevos comerciales son vulnerables a la contaminación por microorganismos comensales y patógenos, mismos que representan un desafío significativo para la seguridad alimentaria y la salud pública. El objetivo fue evaluar el efecto de la temperatura de incubación en la curva del crecimiento de 10 cepas bacterianas provenientes de huevos comerciales del municipio de Tulancingo Hidalgo. Se realizó una descripción morfológica de las cepas y se determinó su crecimiento, así como su tiempo de generación a 4°C, 15°C y 37°C. Las bacterias evaluadas presentaron diferencias en la adaptación a las diferentes temperaturas evaluadas, se determinó que *Proteus mirabilis* alcanzó su máximo crecimiento a las 6 horas de incubación con un tiempo de generación de 21 minutos a una temperatura de 4°C. Las bacterias evaluadas muestran un estado de latencia a 4°C, lo anterior pone en evidencia que el mantener los huevos en refrigeración no garantiza que se detenga el crecimiento de las bacterias y generen alteraciones en estos.

Palabras Clave: Huevos, Bacteria, Gram negativa, Psicrófilas, *Proteus mirabilis*.

Abstract

Commercial eggs are vulnerable to contamination by commensal and pathogenic microorganisms, which represent a significant challenge to food safety and public health. The aim was to evaluate the effect of incubation temperature on the growth curve of 10 bacterial strains from commercial eggs from the municipality of Tulancingo Hidalgo. A morphological description of the strains was carried out and their growth was determined, as well as their generation time at 4°C, 15°C and 37°C. The bacteria evaluated showed differences in adaptation to the different temperatures evaluated; it was determined that *Proteus mirabilis* reached its maximum growth after 6 hours of incubation with a generation time of 21 minutes at a temperature of 4°C. The bacteria evaluated show a state of latency at 4°C, which shows that keeping the eggs refrigerated does not guarantee that the growth of the bacteria will stop and generate alterations in them.

Keywords: Eggs, Bacteria, Gram negative, Psychrophilic, *Proteus mirabilis*.

1. Introducción

El huevo para plato es una fuente rica de nutrientes, como: proteínas, vitaminas, hierro y otros minerales, sin embargo este producto tiene una alta actividad de agua que lo convierte en un producto alimenticio altamente perecedero (Li *et al.*, 2017). El huevo es uno de los alimentos incluidos en la canasta básica y de la dieta mexicana con un consumo anual per cápita de 24 kg, (UNA, 2023). En cuanto, a la producción a nivel nacional según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

(SIAP) en el año 2023, se produjeron 3 millones 172 mil toneladas (SIAP, 2023). Debido a la alta producción y demanda en el consumo de este producto, se requiere garantizar la calidad en la cadena de producción y suministro del huevo. En México existe una Norma Oficial Mexicana que establece los estándares para el recuento total de bacterias mesófilas aerobias (5×10^4 UFC/g), de coliformes totales (< 3 número más probable/mL) y para *Salmonella* ausencia en 25 g (NOM-159-SSA1-2016). A pesar de la existencia de la Norma Oficial Mexicana, gran parte de la población desconoce el

*Autor para la correspondencia: adrian_zaragoza@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: go421391@uaeh.edu.mx (César J. González-Cruz), jose_aparicio@uaeh.edu.mx (José E. Aparicio Burgos), nallely_rivero@uaeh.edu.mx (Nallely Rivero-Pérez), ga280669@uaeh.edu.mx (Rosa M. Gayosso San Juan), wendy_delgadillo9970@uaeh.edu.mx (Wendy M. Delgadillo Ávila), en línea (postprint) desde el DD/MM/AAAA, publicado el DD/MM/AAAA. **DOI:** <https://doi.org/10.29057/icbi.vXXiYY.ZZZZ>

adrian_zaragoza@uaeh.edu.mx (Adrian Zaragoza-Bastida)

Historial del manuscrito: recibido el DD/MM/AAAA, última versión-revisada recibida el DD/MM/AAAA, aceptado el DD/MM/AAAA,

manejo adecuado del huevo y de los métodos para su conservación (Preciado and Elton, 2015). Algunos recomiendan realizar una limpieza y desinfección con compuestos químicos para disminuir la posible carga microbiana del cascarón (Olse et al., 2017; Clímaco et al., 2018; Melo et al., 2019).

Al respecto se ha reportado la presencia de los géneros bacterianos: *Escherichia*, *Staphylococcus* y *Salmonella* en el cascarón de huevos (Sander et al., 2003), así como la presencia de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en el interior de los huevos intactos y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en huevos rotos (Guard-Petter, 2001; Kang et al., 2006). Se ha demostrado que las cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonizan los tejidos del tracto reproductivo de las gallinas y de esta forma contaminan los huevos (Gast et al., 1990; Keller et al., 1995).

Por otro lado, las bacterias patógenas y comensales pueden contaminar los huevos comerciales en cualquier etapa de la cadena de producción, desde la granja hasta el consumidor final (Marc et al., 2024). Para aumentar la vida de anaquel del huevo, es almacenado en refrigeración, sin embargo, esta práctica puede favorecer la contaminación y el crecimiento de las bacterias psicótrofas (Adam et al., 2010; Koppel et al., 2016; da Silva et al., 2022). Las bacterias psicótrofas son muy resistentes y son capaces de soportar entornos extremadamente fríos, entornos que inhibirían el crecimiento de otros microorganismos (Moyer and Morita, 2007).

Algunos de los géneros con especies psicrófilas reportadas en los alimentos son: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* y *Micrococcus* (García et al., 1993; López et al., 2006; Zheng et al., 2022; Fisayo and Onoyinka, 2023; Al-brahim et al., 2023). En particular, se sabe que los géneros bacterianos que contaminan el huevo son: *Bacillus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Kone et al., 2013; Neira, C., Laca et al., 2017). Algunos de estos géneros bacterianos producen toxinas psicotolerantes en el interior del huevo, y que están relacionadas con importantes enfermedades humanas (Baron et al., 2007; Pinchuk et al., 2010; Wang et al., 2017). Sin embargo, no se ha prestado la importancia necesaria en la identificación, en las tasas de crecimiento y en los tiempos de generación de otras bacterias con características psicótrofas en los huevos comerciales mexicanos. Por lo, que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura de incubación en la curva del crecimiento de 10 cepas bacterianas provenientes de huevos comerciales del municipio de Tulancingo Hidalgo, para determinar su capacidad adaptativa.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención del material biológico

Se eligieron 10 cepas bacterias aisladas de la parte interna de huevos comerciales de Tulancingo Hidalgo. Las bacterias fueron identificadas previamente y resguardadas en la colección bacteriana del laboratorio de bacteriología de investigación, del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia del

Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), las cuales se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Bacterias seleccionadas con su clasificación Gram.

Bacteria	Clasificación Gram
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Staphylococcus sciuri</i>	+
<i>Bacillus circulans</i>	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+
<i>Lactococcus lactis</i>	+
<i>Staphylococcus xylosum</i>	+
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	+

2.2 Preparación de las bacterias y determinación de la morfología bacteriana

Las cepas fueron reactivadas de la crioconservación por medio de su inoculación en el medio sólido Mueller Hinton (BD, Dibico), y posteriormente se verificó su pureza por medio de la tinción de Gram.

La identificación de la morfología de las cepas bacterianas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Aguilar-Romero et al., 2014.

2.3 Determinación de las curvas de crecimiento

Para determinar las curvas de crecimiento se siguió la metodología propuesta por (Myers et al., 2013; Katipoglu-Yazan et al., 2023) con algunas modificaciones. Las bacterias a evaluar fueron inoculadas en caldo nutritivo (BD Bioxon) e incubadas a 37°C por 24 horas, este proceso se repitió para garantizar la viabilidad de las bacterias.

Las bacterias fueron ajustadas al 0.5 del patrón de turbidez de McFarland (Remel, R20421) y posteriormente se inocularon 0.5 mL de la bacteria ajustada en 4.5 mL de caldo nutritivo para su incubación a las diferentes temperaturas, las temperaturas a evaluar fueron 4°C, 15°C y 37°C, cada evaluación fue realizada por triplicado.

De cada repetición se tomaron 100 µL y se colocaron en una placa de 96 pozos para medir la absorbancia, la cual se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, modelo Multiskan™ FC) a una longitud de onda de 620 nm para obtener la absorción (crecimiento) de cada muestra, las lecturas se realizaron a las 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36 y 48 horas.

2.4 Cálculo de la velocidad de crecimiento de las bacterias aisladas del interior del huevo

A partir de los datos obtenidos se calculó la tasa o velocidad de crecimiento denominada con la letra griega μ y el tiempo de generación denominado con la letra g establecidos por el

modelo de Monod (Monod, 1949), para el crecimiento de cultivos bacterianos utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Donde N representa el número de células a un determinado tiempo y N_0 representa el número de células en un cultivo bacteriano; según lo establecido por la ley de Lambert-Beer la turbidez (absorción) es proporcional a la concentración de partículas (Acebo-González and Hernández-García, 2013). En donde $N = Abs$. t_2 corresponde al tiempo dos expresado en minutos mientras que t_1 corresponde al tiempo uno expresado en minutos. Dando como resultado la siguiente modificación a (1):

$$\mu = \frac{\ln Abs_2 - \ln Abs_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

Abs_2 corresponde a la absorción obtenida en un tiempo dos y Abs_1 corresponde a la absorción obtenida en un tiempo uno; esta expresión debe resultar en unidades de minutos⁻¹. Las variables t_2 y t_1 no sufren modificaciones.

2.5 Cálculo del tiempo de generación de las bacterias aisladas del interior del huevo

Para calcular el tiempo de generación (g) se usó la siguiente ecuación (Monod, 1949):

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3)$$

Donde μ corresponde a la velocidad de crecimiento y las unidades resultantes deben estar expresadas en minutos.

2.6 Análisis estadístico

Para el análisis de las curvas de crecimiento, las bacterias se dividieron en dos grupos de acuerdo con las absorbancias obtenidas, el Grupo 1: *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus sciuri*. Grupo 2: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus circulans*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus xylosum* y *Staphylococcus chromogenes*.

Los datos del crecimiento obtenidos por absorbancia de las cepas bacterianas fueron sometidos al análisis de varianza y en dependencia de la significancia, las medias se compararon mediante la prueba de Friedman con el programa GraphPad Prism versión 10.0.0 para Windows (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA).

3. Resultados

3.1 Descripción morfológica de las diez cepas bacterianas

Se realizó la descripción de la morfología de las diez cepas bacterianas (Tabla 1). Se observó una textura lisa y color no pigmentado, características comunes en las cepas analizadas, con respecto a la apariencia de los bordes de las colonias varía entre ondulado y entero. Las elevaciones de los aislados fueron convexas, planas y elevadas con una consistencia de suave a dura y mucoides.

3.1 Determinación de las curvas de crecimiento

En la Figura 1 se muestra la curva de crecimiento correspondiente al grupo 1 en donde se observa que *Proteus mirabilis* presentó la mayor velocidad de mayor crecimiento a 36 °C (Temperatura control) de los primeros minutos de evaluación ($p \leq 0.05$), seguido de *Staphylococcus sciuri*, sin embargo, esta cepa alcanzó su punto máximo de crecimiento después de las 20 horas en comparación con las otras cepas. Las cepas de *S. marcescens*, *B. licheniformis* y *E. coli* mostraron una velocidad de crecimiento similar sin mostrar diferencias estadísticas significativas ($p \geq 0.05$).

Proteus mirabilis y *Bacillus licheniformis* fueron las cepas más adaptadas a la temperatura de 15°C sin mostrar diferencias estadísticas significativas a las 36 y 48 horas ($p \geq 0.05$), sin embargo, en los primeros tiempos lectura se observó una mayor adaptación de *Bacillus licheniformis*. Aunado a lo anterior, se observó que la bacteria con la menor adaptación a esta temperatura fue *Staphylococcus sciuri* con una absorbancia menor al 0.2 nm.

Se determinó que a 4°C *Proteus mirabilis* fue la bacteria con el mayor crecimiento y fue la que mejor se adaptó a esa temperatura de incubación, mostrando diferencias estadísticas con las otras cepas ($p \leq 0.05$). En comparación con las otras bacterias, y mostró un crecimiento máximo en un tiempo menor a 10 horas. El resto de las bacterias han mostrado un crecimiento bastante similar.

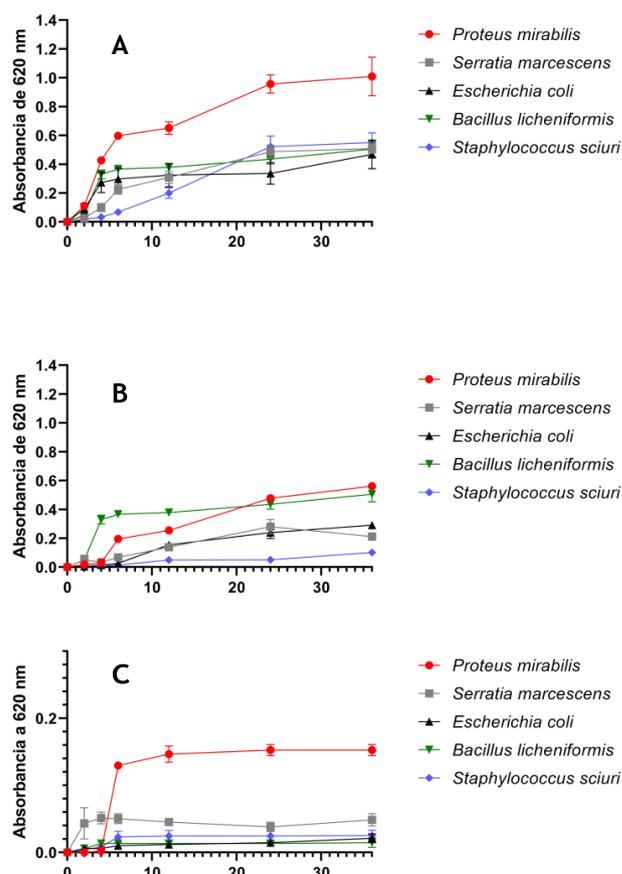


Figura 1. Curva de crecimiento a 36°C (A), 15°C (B) y 4°C (C) de *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *B. licheniformis* y *S. sciuri*, a los tiempos 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36 y 48 horas.

En la Figura 2, se muestra la curva de crecimiento correspondiente al grupo 2, donde se puede observar una mejor adaptación de *E. faecalis* a 36 °C y *S. chromogenes* fue la bacteria que mostró un menor crecimiento, además, de mostrar un periodo de adaptación muy extenso en comparación con las otras cepas. El resto de las cepas han tenido un crecimiento muy similar.

Aunado a lo anterior, se muestra el crecimiento a 15°C, donde se determinó que *E. faecalis* fue la bacteria con una mejor respuesta de crecimiento a esta temperatura ($p \leq 0.05$). *B. circulans*, *L. lactis*, *S. xylosus* presentaron un crecimiento similar ($p \geq 0.05$), y *S. chromogenes* fue la bacteria con la menor adaptación.

Con respecto al crecimiento a 4°C, se observó un crecimiento limitado ya que se determinaron una absorbancia por debajo del 0.1 nm, sin embargo, aun y con crecimiento limitado *E. faecalis* fue la bacteria más adaptada a esta temperatura.

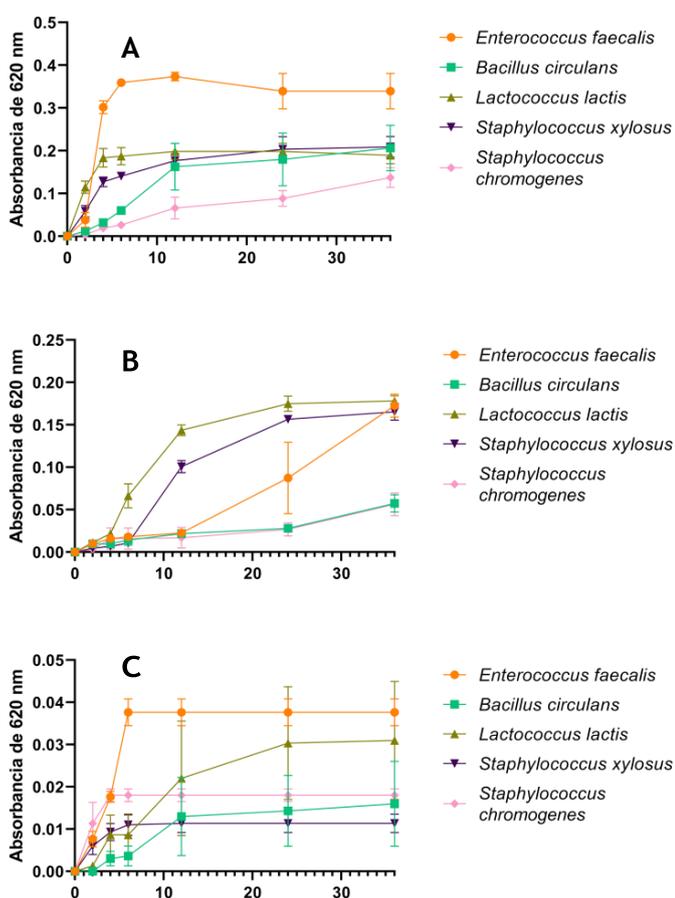


Figura 2. Curva de crecimiento a 36°C (A), 15°C (B) y 4°C (C) de *E. faecalis*, *B. circulans*, *L. lactis*, *S. xylosus* y *S. chromogenes*, a los tiempos 0, 2, 4, 6, 12, 24, 36 y 48 horas.

3.2 Tiempo de generación de las bacterias aisladas del interior del huevo

Respecto al tiempo de generación expresado en la Tabla 2, se observó que *P. mirabilis* fue la bacteria que mejor se ha

adaptado a 4°C, con un tiempo de generación de 21 minutos, repitiendo la misma tendencia a 15°C con un tiempo de generación de 45 minutos, finalmente a 36°C la bacteria que mostro el menor tiempo de generación fue *E. faecalis* con un tiempo de 40 minutos. En la tabla 2 se muestra a detalle el tiempo de generación para cada bacteria.

Tabla 2. Tiempo de generación calculada en minutos para las bacterias evaluadas.

Bacteria	Tiempo de generación en Minutos		
	4°C	15°C	36°C
<i>S. marcescens</i>	491	205	61
<i>E. coli</i>	163	86	76
<i>P. mirabilis</i>	21	45	62
<i>S. sciuri</i>	113	145	135
<i>B. circulans</i>	414	211	131
<i>B. licheniformis</i>	104	99	44
<i>E. faecalis</i>	100	177	40
<i>L. lactis</i>	268	128	177
<i>S. xylosus</i>	188	233	107
<i>S. chromogenes</i>	180	53	53

4. Discusión

Todas las colonias bacterianas no presentaron pigmentación de consistencias suaves y mucoides, y con bordes enteros. De acuerdo con Aguilar-Romero y cols., 2014, algunas especies del género *Staphylococcus* no muestran pigmentación y presentan una forma circular coincidiendo con nuestros resultados. En el caso del género de *Escherichia* algunas colonias puede presentar un color grisáceo y de consistencia mucoide (Aguilar-Romero *et al.*, 2014), características reportadas en el presente estudio. Wakita y cols., 2007 reportan que las colonias de *Bacillus* sp. forman un anillo concéntrico y de borde irregular en el centro. En nuestras cepas de *Bacillus* sp. analizadas no se observó el anillo concéntrico, sin embargo, si presentaron bordes irregulares y circulares.

Las cepas evaluadas fueron capaces de crecer a 36°C, con crecimiento abundante de *P. mirabilis*; *S. marcescens*; *E. coli*; *B. licheniformis*; *E. faecalis*; *S. sciuri* (Figuras 1 y 2). Estos resultados son similares a los reportados por Jurado y Gúzman, 2015, en donde observaron que la densidad máxima fue de 3.3×10^{10} UFC/mL de bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* cultivadas a 35°C.

En cuanto a las pruebas fisiológicas de crecimiento a bajas temperaturas (4 °C y 15 °C), de las diez bacterias evaluadas solo *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *B. licheniformis* presentaron crecimiento a 15°C (Figura 1 y 2), pero únicamente *P. mirabilis* mostro un crecimiento abundante a 4°C con diferencia significativa ($p < 0.05$) (Figura 3). Al respecto se sabe que *B. subtilis* aislada de la rizosfera de plantas de papa puede crecer a 4°C (Calvo y Zuñiga, 2010) y *Bacillus* spp. aislados de la leche cruda tienen la capacidad de crecer a temperaturas de 2°C por un largo tiempo (Griffiths and

Phillips, 1990), información que coincide con lo reportado en el presente estudio.

Las bacterias psicrófilas son microorganismos que tienen la capacidad de multiplicarse a bajas temperaturas y su temperatura óptima de crecimiento es baja, aproximadamente a 15°C o inferior e incluso a temperaturas de refrigeración (4°C) (Moyer and Morita, 2007).

Existen varias estrategias de supervivencia usadas por las bacterias psicrotróficas bajo condiciones de estrés por frío, entre las cuales destacan i) la organización estructural de la envoltura celular (para el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CFL1) y de la membrana plasmática con ácidos grasos cíclicos y poliinsaturados en los fosfolípidos de sus membranas (aumentando la fluidez de la membrana) (Schinik, 1999); ii) La producción de moléculas crioprotectoras como: azúcares, aminoácidos, polialcoholes y polímeros, y algunos puede mantener la integridad de la membrana y en mantener la osmoprotección bacteriana (Vivanco-Calixto et al., 2016; Hubalek, et al., 2003; Cleland et al., 2004; Morales-García et al., 2010); iii) Producción de polisacáridos para potenciar la tolerancia a las bajas temperaturas como lo hace la bacteria *Pseudoalteromonas* sp. SM20310 (Liu, 2013) y iv) Una disminución de la expresión de genes ligados al metabolismo energético y a la incorporación de fuentes de carbono, así como un aumento en la producción de la proteína de shock por frío producida por la bacteria *Psychrobacter arcticus* 273-4 (Kuhn, 2012). Estrategias que, no fueron evaluadas en el presente estudio, sin embargo, podrían ser la explicación del crecimiento bacteriano a bajas concentraciones de las cepas evaluadas.

Proteus mirabilis es un bacilo Gram negativo, zoonótico y es el causante de infecciones urinarias y respiratorias en pacientes humanos (Rubio-Sánchez and Lepe-Balsalobre, 2022; Villamil et al., 2006). Varios estudios han reportado la presencia *Proteus mirabilis* en carne de pollo de venta al público y en lesiones patológicas en tejidos de aves de engorda (Guerra et al., 2023; Sánchez et al., 2020; Sánchez et al., 2021). Sin embargo, la presencia de esta bacteria en el interior de los huevos comercializados al por menor no se había reportado; esto podría explicarse debido a la amplia distribución en el ambiente de esta bacteria, ya que forma parte del microbiota de los animales y por su capacidad de adherencia a las células HEp-2 del tejido urinario (Drzewiecka, 2016; Sánchez et al., 2021; Espinosa-Antúnez et al., 2019). De acuerdo con lo anteriormente mencionado, la bacteria fácilmente puede alcanzar el cascaron e ingresar al interior del huevo por un mal manejo del producto.

El tiempo de generación en bacterias se refiere al tiempo que una célula bacteriana necesita para dividirse en dos por división binaria (Baer and Keady, 2021). En condiciones ideales de temperatura y medios de cultivos, algunas bacterias pueden duplicarse rápidamente, mientras que otras requieren más tiempo. Las bacterias mesófilas como: *E. coli* tiene un tiempo de generación de 20 minutos y *Staphylococcus aureus*, necesita 30 minutos para dividirse en dos células (Zu and Lebek, 1980; Belay and Rasooly, 2002). En contraste, con los resultados de nuestro estudio, en donde se observó que promedio en el tiempo de generación de las diez bacterias

analizadas fue de 89 minutos a 36°, incluso la cepa de *E. coli* necesito 76 minutos resultado que no coincide los tiempos anteriormente descritos y la bacteria que presento un menor tiempo de generación fue *Bacillus licheniformis* con 44 minutos (Tabla 2). Así mismo se observó una tendencia en el aumento del tiempo de generación de 138 minutos a 204 minutos en la mayoría de las bacterias crecidas a 15°C y a 4°C (Tabla 2), sin embargo, *Proteus mirabilis* presentó un tiempo de generación más corto, de 21 minutos a 4°C en comparación con las bacterias analizadas. En este contexto, la bacteria del hielo marino del Ártico *Psychromonas ingrahamii* ha demostrado tener la temperatura de crecimiento más baja, de 240 horas a -20 °C (Breezee and Staley, 2004). El crecimiento bacteriano no es infinito ni constante debido a diversas variables, como especies, temperatura, pH y nutrientes disponibles, y el tiempo de generación es crucial para comprender cómo las bacterias se multiplican y se adaptan a cualquier entorno.

5. Conclusiones

Las bacterias evaluadas presentaron diferencias en la adaptación a las diferentes temperaturas evaluadas. Las bacterias evaluadas muestran un estado de latencia al ser sometidas a 4°C, sin embargo, *P. mirabilis* fue la más adaptada con un tiempo de generación de 21 minutos a una temperatura de 4°C. Lo anterior pone en evidencia que el mantener los huevos en refrigeración(4°C) no garantiza que se detenga el crecimiento de las bacterias y generen alteraciones en este.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la asistencia de la Secretaría de Investigación de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

7. Referencias

- Acebo-González, D., & Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(1).
- Aguilar-Romero, F., Anguiano-Báez, R., Atilano-López, D., Bazán-Mora, E., Castañeda-Ramírez, A., Castañón-Olivares, L. R., Chávez-Gris, G., Corona-Barrera, E., De La Peña-Moctezuma, A., Espinosa-González, M. E., Espinosa-Montaño, L. G., García-Delgado, G. A., García-Ortiz, M. Á., Guzmán-Chávez, R. E., Jaramillo-Meza, L., Maldonado-Castro, E., Ovando-Fuentes, D., Rodríguez-Camarillo, S. D., Rodríguez-Sánchez, M. C., Yela-Miranda, I. J. (2014). Atlas Fotográfico de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias (1.a ed.). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Adam, K. H., Flint, S. H., & Brightwell, G. (2010). Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. *International journal of food science & technology*, 45(8), 1539-1544.
- Al-brahim, J. S., Abdalla, O. A., & Alwarqan, A. I. (2023). Identification of Previously Unrecorded Bacilli, Serratia, and Mucor Strains Isolated from Yogurt. *Applied Sciences*, 13(23), 12819.
- Baer, A., & Keady, J. P. (2021). Bacterial Normalized Binary Fission Growth Model. *bioRxiv*, 2021-10.
- Baron, F., Cochet, M. F., Grosset, N., Madec, M. N., Briandet, R., Dessaigne, S., ... & Jan, S. (2007). Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products. *Journal of food protection*, 70(12), 2782-2791.
- Belay, N., & Rasooly, A. (2002). *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. *Journal of food protection*, 65(1), 199-204.

- Breeze, J., Cady, N., & Staley, J. T. (2004). Subfreezing growth of the sea ice bacterium “*Psychromonas ingrahamii*”. *Microbial Ecology*, 47, 300-304.
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39.
- Cleland D, Krader P, McCree C, Tang J, Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J Microbiol Methods*. 2004;58(1):31-8.
- Clímaco, W. L. D. S., Melo, É. D. F., Vaz, D. P., Saldanha, M. M., Pinto, M. F. V. D. S., Fernandes, L. C. C., & Lara, L. J. C. (2018). Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subjected to different sanitizing procedures. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53, 1177-1183.
- da Silva Pires, P. G., Bavaresco, C., & Moraes, P. D. O. (2022). Hundred years of knowledge on table egg refrigeration. *World's Poultry Science Journal*, 78(4), 1007-1019.
- Espinosa-Antúnez, V. K., Castrillón-Rivera, L. E., Vega-Memije, M. E., Valenzuela-Vargas, M. T., Sainz-Espuñes, T., Luna-Herrera, J., & Castañeda-Sánchez, J. I. (2019). *Proteus mirabilis* expressing Plasmid-encoded toxin (Pet) causes urinary tract alterations. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22.
- Drzewiecka, D. (2016). Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. *Microbial ecology*, 72, 741-758.
- Fisayo, O. O., & Onoyinka, A. A. (2023). Contamination of Retailed Yam Products at Two Popular Markets in Ibadan with *Pseudomonas* Spp, and *Flavobacterium* Spp. *Int J Agriculture Technology*, 3(2), 1-7.
- García-López, M. L., Otero, A., García-Fernández, M. C., & Santos, J. A. (1993). Incidencia, comportamiento y control de *Aeromonas hydrophila* en productos cárnicos y lácteos. *Microbiología*, 9, 49-56.
- Gast, R. K., and C. W. Beard. 1990. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis.* 34:991-993.
- Guerra, D. C., Aguilar, S. E., Usiña, J. G., Miranda, C. M., & Quintana, S. C. (2023). Identificación de *Proteus mirabilis* en carne de pollo procedente de comercios en Cantón Ambato. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria Pentaciencias*, 5(5), 631-643.
- Guard-Petter, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ. Microbiol.* 3:421-430.
- Griffiths, W.M., Phillips, J.D. (1990): Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk. *International Journal of Dairy Technology* 43, 62-66.
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229.
- Jurado-Gómez H, Gúzman-Insuasty M. 2015. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. *Rev Med Vet Zoot.* 62(2): 23-39.
- Kang, H., Loui, C., Clavijo, R. I., Riley, L. W., & Lu, S. (2006). Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Epidemiol Infect*, 134(5), 967-976. doi:10.1017/S0950268806006054
- Katipoglu-Yazan, T., Dev, S., Desmond-Le Quémener, E., & Bouchez, T. (2023). Data on the influence of temperature on the growth of *Escherichia coli* in a minimal medium containing glucose as the sole carbon source for the joint computation of growth yields and rates at each temperature from 27 to 45°C. *Data in Brief*, 48, 109037. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109037>
- Koppel, K., Sosa, M., Gutierrez, N. G., Cardinal, P., Godwin, S. L., Cates, S. C., & Chambers IV. (2016). Consumer practices for purchase, storage, and preparation of poultry and eggs in selected North and South American countries: A pilot study. *Vitae*, 23(1), 58-64.
- Keller, L. H., C. E. Benson, K. Krotec, and R. J. Eckroade. 1995. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect. Immun.* 63:2443-2449.
- Kone, A. Z., Jan, S., Le Maréchal, C., Grosset, N., Gautier, M., Puterflam, J., & Baron, F. (2013). Identifying risk factors for eggshell contamination by *Bacillus cereus* group bacteria in French laying farms. *British poultry science*, 54(3), 298-305.
- Kuhn, E. (2012). Toward understanding life under subzero conditions: the significance of exploring psychrophilic “cold-shock” proteins. *Astrobiology*, 12(11), 1078-1086.
- Laurencio-Silva, M., Arteaga, F., Rondón-Castillo, A. J., Ormazá, J., Pinto, J., Pazmiño, D., & Macías, I. (2017). Potencial probiótico in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes de la vagina de vacas lecheras. *Pastos y Forrajes*, 40(3), 206-215.
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., & Martínez-Suárez, J. V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(4), 224-234.
- Li-Chan, E. C., Powrie, W. D., & Nakai, S. (2017). The chemistry of eggs and egg products. In *Egg Science and Technology* (pp. 105-175). CRC Press.
- Liu, S. B., Chen, X. L., He, H. L., Zhang, X. Y., Xie, B. B., Yu, Y., ... & Zhang, Y. Z. (2013). Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain SM20310. *Applied and environmental microbiology*, 79(1), 224-230.
- Marc, R. A., Mureşan, C. C., Postolache, A. N., Crivei, I. C., Raţu, R. N., Stoica, F., & Veleşcu, I. D. (2024). Advanced Risk and Hazard Analysis in the Egg Sorting-Packing Station Industry from Supplier Selection to Delivery in Chain Stores under GFSI Integrated Food Safety Programs.
- Melo, E. F., Clímaco, W. L. S., Triginelli, M. V., Vaz, D. P., De Souza, M. R., Baião, N. C., & Lara, L. J. C. (2019). An evaluation of alternative methods for sanitizing hatching eggs. *Poultry science*, 98(6), 2466-2473.
- Monod, J. (1949). THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. *Annual Review of Microbiology*, 3(Volume 3, 1949), 371-394. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.
- Morales-García Y-E, Duque E, Rodríguez- Andrade O, de la Torre J, Martínez-Contreras R-D, Pérez R. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Bio Tecnol.* 14(2): 11-29.
- Moyer, C. L., & Morita, R. Y. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs. *Encyclopedia of life sciences*, 1(6).
- Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6(1), 4. doi:10.1186/2046-1682-6-4.
- Neira, C., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2017). Microbial diversity on commercial eggs as affected by the production system. A first approach using PGM. *International journal of food microbiology*, 262, 3-7.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-159-SSA1-2016. Productos y servicios. Huevo y sus productos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Método de prueba. Consultada el 13 de junio en la página: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5510622&fecha=16/01/2018#gsc.tab=0
- Olsen, R., Kudirkienė, E., Thøfner, I., Pors, S., Karlsson-Mortensen, P., Li, L., & Christensen, J. (2017). Impact of egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poultry science*, 96(11), 3901-3911.
- UNA. 2014. Indicadores económicos compendio de indicadores económicos del sector avícola 2023. Disponible en: <https://una.org.mx/compendio-de-indicadores-economicos-del-sector-avicola-2023/>
- Rubio-Sánchez, R., & Lepe-Balsalobre, E. (2022). Importancia de la cristalluria por estruvita en el diagnóstico de la infección urinaria por *Proteus mirabilis*. *Revista mexicana de urología*, 82(5).
- Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*, 2(8), 2177-2197.
- Preciado-Cortés Roxana, S.-P. M. d. C., Elton-Puente Juana Elizabeth., (2015). Análisis del impacto de diferentes métodos de conservación en la calidad del huevo para consumo en el estado de Querétaro. Retrieved from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.26a62fnd2t88>
- Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Munive-Hernández JA, Baez-Rogelio A, et al. Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias BUAP [Internet]*. 2016;1(1):1–10. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.26a62fnd2t88>
- Villamil Cajoto, I., Eynde Collado, A., Villacián Vicedo, M. J., Martínez Rey, C., Rodríguez Otero, L., & Rodríguez Framil, M. (2006, March). Neumonía comunitaria por *Proteus mirabilis*. In *Anales de medicina interna* (Vol. 23, No. 3, pp. 146-146). Arán Ediciones, SL.
- Sánchez, M. S., Baptista, A. A. S., de Souza, M., Menck-Costa, M. F., Justino, L., Nishio, E. K., ... & Rocha, S. P. D. (2020). *Proteus mirabilis* causing cellulitis in broiler chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1353-1362.

- Sánchez, M. S., da Silva, C. R., Silva, L. C., Montini, V. H., Barboza, M. G. L., Guidone, G. H. M., & Rocha, S. P. D. (2021). *Proteus mirabilis* from community-acquired urinary tract infections (UTI-CA) shares genetic similarity and virulence factors with isolates from chicken, beef and pork meat. *Microbial Pathogenesis*, 158, 105098.
- Sander, J. E., Wilson, J. L., Cheng, I. H., & Gibbs, P. S. (2003). Influence of slat material on hatching egg sanitation and slat disinfection. *Journal of Applied Poultry Research*, 12(1), 74-80.
- Schinik, B. (1999). *Habitats of Prokaryotes. U knizi: Biology of Prokaryotes* Ed by Joseph W. Lengeler. Gerhard Drews i Hans G. Schlegel. Gautier, J., Passot, S., Pénicaud, C., Guillemin, H., Cenard, S., Lieben, P., & Fonseca, F. (2013). A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5591-5602.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2024). Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/892964/Huevo_Enero.pdf
- Wakita, J. I., Shimada, H., Itoh, H., Matsuyama, T., & Matsushita, M. (2001). Periodic colony formation by bacterial species *Bacillus subtilis*. *Journal of the physical society of Japan*, 70(3), 911-919.
- Wang, X., Du, H., & Xu, Y. (2017). Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, 244, 27-35.
- Zheng, R., Qing, H., Ma, Q., Huo, X., Huang, S., Zhao, L., & Ji, C. (2022). A Newly isolated *alcaligenes faecalis* ANSA176 with the capability of alleviating immune injury and inflammation through efficiently degrading ochratoxin A. *Toxins*, 14(8), 569.
- Zu, P., & Lebek, G. (1980). Generation time-prolonging R plasmids: correlation between increases in the generation time of *Escherichia coli* caused by R plasmids and their molecular size. *Plasmid*, 3(1), 65-69.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acebo-González, D., & Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(1).
- Adam, K. H., Flint, S. H., & Brightwell, G. (2010). Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. *International journal of food science & technology*, 45(8), 1539-1544.
- Aguilar C, Álvarez-Mayorga BL, Castro-Rosas J, Cid-Pérez TS, Garcia S, Heredia N, Hernández-Iturriaga M, Hernández ME, Nevarez-Moorillón GV, Tejeda-Trujillo F, Ventura-Sobrevilla JM. Microbiological Quality of Eggs in Six States of Mexico (abstract IAFP 2018). *J Food Prot Suppl A* 2018; 71:127–128.
- Aguilar-Romero, F., Anguiano-Báez, R., Atilano-López, D., Bazán-Mora, E., Castañeda-Ramírez, A., Castañón-Olívares, L. R., Chávez-Gris, G., Corona-Barrera, E., De La Peña-Moctezuma, A., Espinosa-González, M. E., Espinosa-Montaño, L. G., García-Delgado, G. A., García-Ortiz, M. Á., Guzmán-Chávez, R. E., Jaramillo-Meza, L., Maldonado-Castro, E., Ovando-Fuentes, D., Rodríguez-Camarillo, S. D., Rodríguez-Sánchez, M. C., Yela-Miranda, I. J. (2014). *Atlas Fotográfico de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias (1.a ed.)*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Anhalt, G., S. Wenzel, and P. Conrad. (1976). Modelluntersuchungen zur Rückstandsbildung im Hiihnerei nach therapeutischer Verabreichung antibakteriell-wirksamer Substanzen. *Arch. Lebensmittelhyg.* 27:201-205.
- Akyurek, H. and Okur, A.A. (2009) Effect of Storage Time, Temperature and Hen Age on Egg Quality in Free-Range Layer Hens. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8 (10): 1953-1958.
- Al-brahim, J. S., Abdalla, O. A., & Alwarqan, A. I. (2023). Identification of Previously Unrecorded Bacills, Serratia, and Mucor Strains Isolated from Yogurt. *Applied Sciences*, 13(23), 12819.
- Baer, A., & Keady, J. P. (2021). Bacterial Normalized Binary Fission Growth Model. *bioRxiv*, 2021-10.
- Baron, F., Cochet, M. F., Grosset, N., Madec, M. N., Briandet, R., Dessaigne, S., ... & Jan, S. (2007). Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products. *Journal of food protection*, 70(12), 2782-2791.
- Belay, N., & Rasooly, A. (2002). *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. *Journal of food protection*, 65(1), 199-204.
- Board, R. G. (1964). The Growth of Gram-Negative Bacteria in the Hen's Egg. *Journal of Applied Microbiology*, 27, 350-364.
- Board, R. G. (1969). The microbiology of the hen's egg. *Adv. App!. Microbiol. II*: 245-281.

- Board, R. G. (1977). The microbiology of eggs. p. 49-64. In W. I. Stadelman and O. J. Cotterill (eds.). Egg science and technology. AVI Publishing Co., Inc., Westport. Connecticut.
- Board, R. G., J. C. Ayres, A. A. Kraft, and R. H. Forsythe. 1964. The microbiological contamination of egg shells and egg packing materials. *Poult. Sci.* 43:584-595
- Bravo Arredondo, Paula. (2011). Efecto del cambio de temperatura sobre la penetración de *Salmonella Enteritidis* a través de la cáscara del huevo. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131518>
- Breeze, J., Cady, N., & Staley, J. T. (2004). Subfreezing growth of the sea ice bacterium “*Psychromonas ingrahamii*”. *Microbial Ecology*, 47, 300-304.
- Brendl, J., and S. Klein. (1976). Some natural substances in egg white as components of the antimicrobial barrier in the egg. (In Czech). *Prumysl Potravin* 27:467-469.
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39.
- Cleland D, Krader P, McCree C, Tang J, Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J Microbiol Methods*. 2004;58(1):31-8.
- Clímaco, W. L. D. S., Melo, É. D. F., Vaz, D. P., Saldanha, M. M., Pinto, M. F. V. D. S., Fernandes, L. C. C., & Lara, L. J. C. (2018). Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subjected to different sanitizing procedures. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53, 1177-1183.
- Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., Castro-del Campo, N. (2019). The last 50 years of *Salmonella* in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias 6(nesp): Inocuidad Alimentaria*, e540
- da Silva Pires, P. G., Bavaresco, C., & Moraes, P. D. O. (2022). Hundred years of knowledge on table egg refrigeration. *World's Poultry Science Journal*, 78(4), 1007-1019.
- Ehlers, L. (2021). Baking School | Day 1- Eggs. Laura The Gastronomist. Recuperado 4 de julio de 2024, de <https://laurathegastro.com/cooking-series/eggs-baking-school>
- Espinosa-Antúnez, V. K., Castrillón-Rivera, L. E., Vega-Memije, M. E., Valenzuela-Vargas, M. T., Sainz-Espuñes, T., Luna-Herrera, J., & Castañeda-Sánchez, J. I. (2019). *Proteus mirabilis* expressing Plasmid-encoded toxin (Pet) causes urinary tract alterations. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22.
- European Food Safety Authority (EFSA), & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 21(12), e8442
- Donovan, I. W., R. A. Beardslee, and K. D. Ross. (1976). Formation of monoferric ovotransferrins in the presence of chelates. *Biochem. J.* 153:631-639
- Drzewiecka, D. (2016). Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. *Microbial ecology*, 72, 741-758.
- Feeny, R. E., E. D. Ducay, R. S. Sliva, and L. R. Macdonnell. 1952. Chemistry of shell egg deterioration: The egg white proteins. *Poult. Sci.* 31 :639-647.
- Fisayo, O. O., & Onoyinka, A. A. (2023). Contamination of Retailed Yam Products at Two Popular Markets in Ibadan with *Pseudomonas* Spp, and *Flavobacterium* Spp. *Int J Agriculture Technology*, 3(2), 1-7.
- Florian, M. L. E., and P. C. Trussell. (1957). Bacterial spoilage of eggs. IV. Identification of spoilage organisms. *Food Technol* 11 :56-60
- Fromm, D. (1963). Permeability of the hen's egg shell. *Poult. Sci.* 42:1271.

- Garibaldi, J. A., and I. L. Stokes. 1958. Protective role of shell membranes in bacterial spoilage of eggs. *Food Res.* 23:283-290.
- Garibaldi, J. A. (1960). Factors in egg white which control growth of bacteria. *Food Res.* 25:337-344.
- García-López, M. L., Otero, A., García-Fernández, M. C., & Santos, J. A. (1993). Incidencia, comportamiento y control de *Aeromonas hydrophila* en productos cárnicos y lácteos. *Microbiología*, 9, 49-56.
- Gast, R. K., and C. W. Beard. 1990. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis.* 34:991-993.
- Geoffrey, P., and C. J. Bailey. 1975. The action of hen and goose lysozyme on the cell wall peptidoglycan of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem. Soc. Trans.* 3:1212-1214
- Godínez-Oviedo, A., Tamplin, M. L., Bowman, J. P., & Hernández-Iturriaga, M. (2020). *Salmonella enterica* in Mexico 2000–2017: epidemiology, antimicrobial resistance, and prevalence in food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 98-118.
- Guerra, D. C., Aguilar, S. E., Usiña, J. G., Miranda, C. M., & Quintana, S. C. (2023). Identificación de *Proteus mirabilis* en carne de pollo procedente de comercios en Cantón Ambato. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria Pentaciencias*, 5(5), 631-643.
- Guard-Petter, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ. Microbiol.* 3:421-430.
- Guzmán-Gómez, G., Valdovinos, M. A. A., Cabrera-Díaz, E., Pérez-Montaña, J. A., Muñoz-Valle, J. F., Torres-Vitela, M. R., & Ruiz-Quezada, S. L. (2013). Frequency of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in five commercial brands of chicken eggs using a combined method of enrichment and nested-PCR. *Journal of food protection*, 76(3), 429-434
- Griffiths, W.M., Phillips, J.D. (1990): Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk. *International Journal of Dairy Technology* 43, 62-66.
- Haines, R. B. (1939). *Microbiology in the preservation of hens eggs*. Rep. Food Invest. Bd. 47. H.M.S.O., London.
- Haines, R. B., and T. Moran. (1940). Porosity of, and bacterial invasion through the shell of the hen's egg. *J. Hyg., Camb.* 40:453- 461
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229.
- Jin, Y.H., Lee, K.T., Lee, W.I. and Han, Y.K. (2011) Effects of Storage Temperature and Time on the Quality of Eggs from Laying Hens at Peak Production. *Australasian Journal of Animal Sciences* 24 (2): 279-284.
- Jurado-Gómez H, Gúzman-Insuasty M. 2015. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. *Rev Med Vet Zoot.* 62(2): 23-39.
- Kang, H., Loui, C., Clavijo, R. I., Riley, L. W., & Lu, S. (2006). Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Epidemiol Infect*, 134(5), 967-976. doi:10.1017/s0950268806006054
- Katipoglu-Yazan, T., Dev, S., Desmond-Le Quémener, E., & Bouchez, T. (2023). Data on the influence of temperature on the growth of *Escherichia coli* in a minimal medium containing glucose as the sole carbon source for the joint computation of growth

- yields and rates at each temperature from 27 to 45°C. *Data in Brief*, 48, 109037. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109037>
- Keller, L. H., C. E. Benson, K. Krotec, and R. J. Eckroade. 1995. Salmonella enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect. Immun.* 63:2443-2449.
- Koppel, K., Sosa, M., Gutierrez, N. G., Cardinal, P., Godwin, S. L., Cates, S. C., & CHAMBERS IV, E. (2016). Consumer practices for purchase, storage, and preparation of poultry and eggs in selected North and South American countries: A pilot study. *Vitae*, 23(1), 58-64.
- Kone, A. Z., Jan, S., Le Maréchal, C., Grosset, N., Gautier, M., Puterflam, J., & Baron, F. (2013). Identifying risk factors for eggshell contamination by *Bacillus cereus* group bacteria in French laying farms. *British poultry science*, 54(3), 298-305.
- Kraus, A., Zita, L., Krunt, O., Chodová, D., Okrouhlá, M., & Krawczyk, J. (2022). Do the differences in egg contamination, penetration, and resistance against microorganisms among the hen genotypes exist? *Annals of Animal Science*, 22(2), 561-574. doi:[doi:10.2478/aoas-2021-0056](https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0056)
- Kraft, A. A. (1992). *Psychotropic Bacteria in Foods Disease and Spoilage*. CRC Press.
- Kuhn, E. (2012). Toward understanding life under subzero conditions: the significance of exploring psychrophilic “cold-shock” proteins. *Astrobiology*, 12(11), 1078-1086.
- Laurencio-Silva, M., Arteaga, F., Rondón-Castillo, A. J., Ormaza, J., Pinto, J., Pazmiño, D., & Macías, I. (2017). Potencial probiótico in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes de la vagina de vacas lecheras. *Pastos y Forrajes*, 40(3), 206-215.
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., & Martínez-Suárez, J. V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista argentina de microbiología*, 38(4), 224-234.
- Li-Chan, E. C., Powrie, W. D., & Nakai, S. (2017). The chemistry of eggs and egg products. In *Egg science and technology* (pp. 105-175). CRC Press.
- Lifshitz, A., R. C. Baker, and H. B. Naylor. (1964). The relative importance of chicken egg exterior structures in resisting bacterial penetration. 1. *Food Sci.* 29:94-99.
- Liu, S. B., Chen, X. L., He, H. L., Zhang, X. Y., Xie, B. B., Yu, Y., ... & Zhang, Y. Z. (2013). Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain SM20310. *Applied and environmental microbiology*, 79(1), 224-230.
- Lloris, M. P. (2019). Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la calidad interna del huevo de gallina. *Selecciones avícolas*(725), 29.
- Madrigal-Portilla, J., Salas-Durán, C., & Macaya-Quirós, S. (2023). Effect of temperature and storage time on hen egg quality. *Agronomía Mesoamericana*, 34(2), 51223. <https://doi.org/10.15517/am.v34i2.51223>
- Marc, R. A., Mureşan, C. C., Postolache, A. N., Crivei, I. C., Raţu, R. N., Stoica, F., & Veleşcu, I. D. (2024). Advanced Risk and Hazard Analysis in the Egg Sorting-Packing Station Industry from Supplier Selection to Delivery in Chain Stores under GFSI Integrated Food Safety Programs.
- Martínez, A. M., Navarrete, J. V., Corpus, M. D. L. O., Valencia, S. D., Huidobro, D. L., & Gutiérrez, V. R. T. (2005). Identificación de *Salmonella enteritidis* en huevo para consumo en la ciudad de México. *Técnica Pecuaria en México*, 43(2), 229-237
- Mayes, F. J., & Takeballi, M. A. (1983). Microbial Contamination of the Hen's Egg: A Review. *Journal of Food Protection*, 46(12), 1092-1098.

doi:<https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.12.1092>

- Melo, E. F., Clímaco, W. L. S., Triginelli, M. V., Vaz, D. P., De Souza, M. R., Baião, N. C., & Lara, L. J. C. (2019). An evaluation of alternative methods for sanitizing hatching eggs. *Poultry science*, 98(6), 2466-2473.
- Monod, J. (1949). THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES. *Annual Review of Microbiology*, 3(Volume 3, 1949), 371-394. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>.
- Morales-García Y-E, Duque E, Rodríguez- Andrade O, de la Torre J, Martínez-Contreras R-D, Pérez R. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *Bio Tecnol.* 14(2): 11-29.
- Moran, T., and M. P. Hale. (1936). Physics of the hen's egg.!. Membranes in the egg. *J. Exp. BioI.* 13:35-40.
- Morfología colonial. (2021). Morfología de las Colonias Bacterianas. Recuperado de <https://ajorepare.blogspot.com/2021/05/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.html>
- Moyer, C. L., & Morita, R. Y. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs. *Encyclopedia of life sciences*, 1(6).
- Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6(1), 4. doi:10.1186/2046-1682-6-4.
- Neira, C., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2017). Microbial diversity on commercial eggs as affected by the production system. A first approach using PGM. *International journal of food microbiology*, 262, 3-7.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-159-SSA1-2016. Productos y servicios. Huevo y sus productos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Método de prueba. Consultada el 13 de junio en la página: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5510622&fecha=16/01/2018#gsc.tab=0
- North, M.O. (1978). Commercial chicken production manual. AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut.
- Muller, M. Ueber das Wachstum and die Lebenst~tigkeit von Bakterien, Sowie den Ablauf Fermentativer Prozesse bei Niederer Temperatur Unter Spezieller Beriicksichtigung des Fleisches als Nahrungsmittel. *Arch. Hyg., Berlin*, 47: 12'7. 1903.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2022). Recuperado de <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Osowski, G. V., Baron, L. F., Coldebella, A., Fonseca, F. N., Mota, S. C. A., Degenhardt, R., & Duarte, S. C. (2019). Comparative study of egg contamination with Salmonella Heidelberg and Salmonella Typhimurium. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 56(1), e150479. doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2019.150479
- Osuga, D. T., and R. E. Feeney. 1974. Avian egg white proteins. In I. E. Leiner (ed). *Toxic constituents of animal foodstuffs*. Academic Press, New York.
- Olsen, R., Kudirkiene, E., Thøfner, I., Pors, S., Karlskov-Mortensen, P., Li, L., & Christensen, J. (2017). Impact of egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poultry science*, 96(11), 3901-3911.
- UNA. 2014. Indicadores económicos compendio de indicadores económicos del sector avícola 2023. Disponible en: <https://una.org.mx/compendio-de-indicadores-economicos-del-sector-avicola-2023/>

- Romanoff, A. L., and A. J. Romanoff. (1949). *The avian egg*. Wiley and Sons. New York.
- Rubio-Sánchez, R., & Lepe-Balsalobre, E. (2022). Importancia de la cristaluria por estruvita en el diagnóstico de la infección urinaria por *Proteus mirabilis*. *Revista mexicana de urología*, 82(5).
- Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*, 2(8), 2177-2197.
- Preciado-Cortés Roxana, S.-P. M. d. C., Elton-Puente Juana Elizabeth,. (2015). Análisis del impacto de diferentes métodos de conservación en la calidad del huevo para consumo en el estado de querétaro.
- Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Munive-Hernández JA, Baez-Rogelio A, et al. Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias BUAP* [Internet]. 2016;1(1):1–10. Available from: <https://www.aytbuap.mx/publicaciones#h.26a62fnd2t88>
- Villamil Cajoto, I., Eynde Collado, A., Villacián Vicedo, M. J., Martínez Rey, C., Rodríguez Otero, L., & Rodríguez Framil, M. (2006, March). Neumonía comunitaria por *Proteus mirabilis*. In *Anales de medicina interna* (Vol. 23, No. 3, pp. 146-146). Arán Ediciones, SL.
- Samli, H.E., Agma, A. and Senkoylu, N. (2005) Effects of Storage Time and Temperature on Egg Quality in Old Laying Hens. *The Journal of Applied Poultry Research* 14: 548-553.
- Sánchez, M. S., Baptista, A. A. S., de Souza, M., Menck-Costa, M. F., Justino, L., Nishio, E. K., ... & Rocha, S. P. D. (2020). *Proteus mirabilis* causing cellulitis in broiler chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1353-1362.
- Sánchez, M. S., da Silva, C. R., Silva, L. C., Montini, V. H., Barboza, M. G. L., Guidone, G. H. M., ... & Rocha, S. P. D. (2021). *Proteus mirabilis* from community-acquired urinary tract infections (UTI-CA) shares genetic similarity and virulence factors with isolates from chicken, beef and pork meat. *Microbial Pathogenesis*, 158, 105098.
- Sander, J. E., Wilson, J. L., Cheng, I. H., & Gibbs, P. S. (2003). Influence of slat material on hatching egg sanitation and slat disinfection. *Journal of applied poultry research*, 12(1), 74-80.
- Sato, Y., and T. Kato. (1978). Changes of chalazae and vitelline membrane during storage of chicken egg. *Intern. Congr. Food Sci. Technol!* Abstr. P168.
- Schinik, B. (1999). Habitats of Prokaryotes. U knizi: *Biology of Prokaryotes* Ed by Joseph W. Lengeler. Gerhard Drews i Hans G. Schlegel. Gautier, J., Passot, S., Pénicaud, C., Guillemain, H., Cenard, S., Lieben, P., & Fonseca, F. (2013). A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of dairy science*, 96(9), 5591-5602.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/892964/Huevo_Enero.pdf
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020. Panorama Nacional de Salmonelosis. <https://dj.senasica.gob.mx/AnalisisSanitario/Secciones/7>
- Sharp, P. F., and G. F. Stewart. 1936. Effect of relative humidity on growth of molds on eggs in storage. *Mem. Cornell Univ. Agric. Exp. SIn. No. 91: 1-1 L*
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología-Secretaría de Salud de México. Histórico Boletín Epidemiológico de 2023. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>

- Szielasko, A. 1913. Die Bedeutung der Eischalenstruktur der Vogel fur die Systematik. J. am. Lpz. 6:52-117. (Quoted by Simons. P.C.M.1971).
- Tabidi, M.H. (2011) Impact of Storage Period and Quality on Composition of Table Egg. *Advances in Environmental Biology* 5 (5): 856-861.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
- Wakita, J. I., Shimada, H., Itoh, H., Matsuyama, T., & Matsushita, M. (2001). Periodic colony formation by bacterial species *Bacillus subtilis*. *Journal of the physical society of Japan*, 70(3), 911-919.
- Walden, C. C., L V. F. Allen, and P. C. Trussell. 1956. The rolc of egg shell membranes in resisting the entry of microorganisms. *Poult. Sci.* 35:1190-1196.
- Wang, X., Du, H., & Xu, Y. (2017). Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, 244, 27-35.
- Weston, W. A. R. D., and E. T. Halnan. (1927). "Black spot" of eggs. *Poult. Sci.* 6:251-258.
- Witter, L. D. (1961). Psychrophilic Bacteria –a review. *J. Dairy Sci.* 44:983-1015.
- Yadav, N. K., and D. V. Vadehra. (1977). Mechanism of egg white resistance to bacterial growth. *J. Food Sci.* 42:97-99.
- Yimenu, S.M., Kim, J.Y., Koo, J. And Kim, B.S. (2017) Predictive modeling for monitoring egg freshness during variable temperature storage conditions. *Poultry Science* 96 (8): 2811-2819.
- Zheng, R., Qing, H., Ma, Q., Huo, X., Huang, S., Zhao, L., ... & Ji, C. (2022). A Newly isolated *alcaligenes faecalis* ANSA176 with the capability of alleviating immune injury and inflammation through efficiently degrading ochratoxin A. *Toxins*, 14(8), 569.
- Zu, P., & Lebek, G. (1980). Generation time-prolonging R plasmids: correlation between increases in the generation time of *Escherichia coli* caused by R plasmids and their molecular size. *Plasmid*, 3(1), 65-69.