



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS  
MICROORGANISMOS PRESENTES EN HUEVO PROCESADO E  
INHIBICIÓN DE LA MICROBIOTA POR DIVERSOS COMPUESTOS CON  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

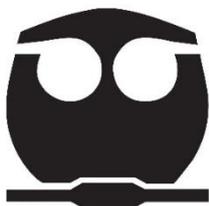
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**CINTLI NAYETZIN HERNÁNDEZ CASTRO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor:** Aleida Mina Cetina

**VOCAL:**                           **Profesor:** Juan Carlos Ramírez Orejel

**SECRETARIO:**                   **Profesor:** Israel García Cano

**1er. SUPLENTE:**               **Profesor:** Hugo Antonio Hernández Pérez

**2do. SUPLENTE:**               **Profesor:** Carmina Montiel Pacheco

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO S-132, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Israel García Cano

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dra. Edith Ponce Alquicira

**SUSTENTANTE:**

Cintli Nayetzin Hernández Castro

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
Definición de huevo.....	2
Producción y consumo .....	2
Importancia del huevo .....	3
Composición .....	3
Ovoproductos.....	5
Microbiota del huevo.....	7
Patógenos .....	8
Microorganismos de descomposición .....	9
Técnicas de identificación de microorganismos .....	11
Dependientes de cultivo .....	11
Independientes de cultivo .....	12
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>14</b>
Inhibición de microorganismos en huevo.....	14
Físicos.....	14
Químicos.....	15
Naturales.....	16
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
OBJETIVO GENERAL .....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>18</b>
Obtención de muestras.....	18
Acondicionamiento de la muestra .....	19
Preparación de medios de cultivo .....	19
Inoculación en medios de cultivo selectivos.....	19
Selección de colonias .....	19
Tinción de Gram.....	19
Extracción de ADN genómico .....	20
Amplificación del gen de referencia ADNr 16S .....	21
Secuenciación .....	21

Extracción de compuestos con actividad antimicrobiana producidos por BAL .....	21
Cuantificación de proteína .....	22
Determinación de la actividad específica inhibitoria por la técnica de difusión en agar .....	22
Efecto de compuestos antimicrobianos sobre el crecimiento de la microbiota total de huevo entero líquido pasteurizado .....	23
Determinación de la actividad antimicrobiana de la SES según la NMX-BB-040-SCFI-1999 .....	23
Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado .....	24
Determinación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) .....	25
Análisis estadístico.....	25
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
Selección de colonias en medios de cultivo .....	26
Extracción de ADN.....	37
Amplificación de la región 16S del ADNr por PCR .....	38
Identificación .....	39
Evaluación de actividad antimicrobiana de las BAL por difusión en agar contra cepas aisladas de huevo líquido pasteurizado .....	42
Efecto de los compuestos antimicrobianos sobre el crecimiento de la microbiota total de huevo entero líquido pasteurizado.....	44
Determinación de la actividad antimicrobiana de la SES según la NMX-BB-040-SCFI-1999 .....	46
Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado .....	46
Sobrenadante de <i>Pediococcus acidilactici</i> MXVK133.....	47
Solución electrolizada de superoxidación (SES) .....	49
Empaque al vacío de huevo líquido pasteurizado .....	51
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>59</b>

## RESUMEN

El huevo es un alimento considerado de alto valor nutricional y por su composición es susceptible al ataque bacteriano. La vida de anaquel del huevo procesado es de 12-14 días debido a la carga microbiana que presenta, de la cual se desconoce el género y especie. Una primera estrategia para inhibir la microbiota contaminante, es identificar a los microorganismos presentes durante las etapas del proceso, utilizando técnicas tradicionales de microbiología en conjunto con métodos moleculares; una vez identificados se pueden utilizar herramientas de origen natural, como los compuestos con actividad antimicrobiana producidos por bacterias ácido lácticas (BAL), los cuales han tenido una gran aceptación en el sector de los alimentos. Por otra parte, en los últimos años se ha empleado una solución electrolizada de superoxidación (SES) como antibacteriano, en la industria de los alimentos, con resultados favorables. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar e inhibir la microbiota del huevo procesado, utilizando compuestos antimicrobianos de origen natural, así como la SES, con la intención de alargar la vida de anaquel del huevo líquido pasteurizado.

Se identificaron 21 microorganismos en muestras de huevo entero líquido antes de pasteurizar y 6 en el pasteurizado, destacando el género *Enterococcus*. Se evaluó la inhibición, por diferentes métodos, de las cepas identificadas posterior a la pasteurización utilizando los extractos crudos de BALs (*Pediococcus acidilactici* MXVK133, *Enterococcus faecium* MXVK29, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*). Diferentes tratamientos fueron evaluados para estimar la vida de anaquel del huevo entero líquido pasteurizado. El tratamiento que logró aumentar la vida útil del producto, de 10 a 34 días, fue la aspersion de SES 30 ppm en la bolsa de empaque y posterior envasado al vacío.

# INTRODUCCIÓN

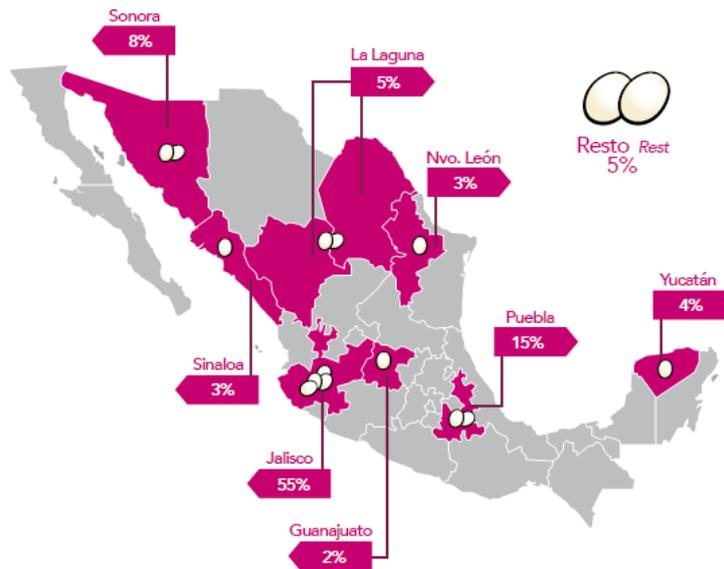
## Definición de huevo

La NOM-159-SSA1-1996 define al huevo como el producto de la ovulación de la gallina (*Gallus domesticus*) y otras especies de aves que sean aceptadas para consumo humano. Tiene una estructura compleja ya que es un medio destinado a contener un embrión. A grandes rasgos, el huevo está constituido por la cáscara, membranas testáceas, clara o albumen y la yema. Los huevos frescos no son fecundados, y por lo tanto no tienen embrión, sólo contienen el óvulo (el cual es la yema).

## Producción y consumo

La industria del huevo ha cambiado, con los años ha ido aumentando tanto su producción como su consumo debido a la alta demanda y a los avances tecnológicos, además de su implementación como ingrediente por las propiedades tecnológicas que aporta en diferentes alimentos.

En las últimas tres décadas se ha aumentado la producción mundial de huevo de 29.3 a 73.8 millones de toneladas (FAO, 2011), siendo China el país que contribuye principalmente a esta cifra aportando el 39%, le sigue Estados Unidos con el 8% y la India con 5%, México ocupa el sexto lugar aportando el 3% (FAO, 2011). Además, dentro de las actividades pecuarias mexicanas, el huevo ocupa el 28.8% de la producción (UNA, 2016). De los estados que producen huevo en México, sobresale Jalisco con el 55%, seguido por Puebla con el 15% y Sonora 8% (Figura 1). Nuestro país destaca como el líder mundial en consumo de huevo entero con 22.3 kg *per cápita* al año (UNA, 2016). Malasia ocupa el segundo lugar con 20.9 kg, seguido por Colombia, Argentina y China. Estados Unidos a pesar de ser un principal productor es el décimo en consumo reportando 11.4 kg de huevo por persona anualmente.



**Figura 1.** Estados mexicanos productores de huevo.

Fuente: UNA, Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola, 2016.

### Importancia del huevo

El huevo ha sido utilizado como alimento por los humanos desde la antigüedad (Romanoff y Romanoff, 1949) y actualmente es un producto de suma importancia ya que es accesible para la población, es de alto valor nutricional, ofrece proteína de excelente calidad (Cepeda *et al.*, 2015) debido a que en su composición se encuentran todos los aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y además tiene una gran versatilidad culinaria debido a sus propiedades funcionales lo que lo hacen muy apreciado en la industria alimenticia y en la cocina por ser un ingrediente básico en distintos platillos aportando textura, color, aroma, brillo, entre otros. Es un producto que forma parte de la dieta de diversos sectores poblacionales y contribuye de manera significativa a cubrir las necesidades del organismo gracias a su riqueza nutricional (Applegate, 2000).

### Composición

Al ser parte del proceso de reproducción de un animal, el huevo presenta una estructura compleja diseñada para proteger a un embrión y proveerlo de todos los nutrientes necesarios para su desarrollo (Domínguez, 2012). Tiene una composición rica y variada, la cual se presenta a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición del huevo

<b>Componentes (%)<sup>1</sup></b>	<b>Huevo entero</b>	<b>Cáscara</b>	<b>Clara</b>	<b>Yema</b>
<b>Agua</b>	74	1	88.5	46.7
<b>Proteínas</b>	13	3.8	10.6	16.6
<b>Hidratos de carbono</b>	1	-	0.9	1
<b>Lípidos</b>	10	95.2	0.03	32.8
<b>Sales minerales</b>	0.1	10.3	0.6	1.1
<b>Vitaminas y minerales que un huevo grande de 50 g aporta (%)<sup>2*</sup></b>				
<b>Vitamina B<sub>12</sub></b>	25	<b>Vitamina B<sub>6</sub></b>	4	
<b>Colina</b>	23	<b>Vitamina E</b>	2	
<b>Riboflavina</b>	15	<b>Selenio</b>	27	
<b>Ácido fólico</b>	9	<b>Fósforo</b>	11	
<b>Vitamina D</b>	9	<b>Hierro</b>	6	
<b>Vitamina A</b>	8	<b>Zinc</b>	4	

\*Porcentajes de cantidades diarias recomendadas basadas en promedios para adultos (hombres y mujeres) de Australia, Canadá, China, Unión Europea y Estados Unidos de América. Fuentes: <sup>1</sup> Naviglio *et al.*, 2012; <sup>2</sup> FAO, 2011.

De las partes que componen al huevo, son fundamentales la clara y la yema ya que en éstas se encuentra el interés nutricional. La clara está constituida principalmente de agua (88%) y de proteínas (10%), las más importantes son la albúmina (54%), ovomucina (11%) y la lisozima (3.4%) que además de sus propiedades nutrimentales tienen valor para la industria alimenticia debido a su funcionalidad. En la yema, alrededor del 50% es agua y es una fuente importante de lípidos (32%) en donde sobresale el contenido de fosfatidilcolina. También se encuentran minerales, dentro de los cuales destacan el selenio, fósforo y zinc (Ortega, 1998), además de vitaminas como la B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, E, D, la cual es importante debido a que pocos alimentos son fuente de ésta, niacina, riboflavina, entre otras

que son liposolubles e hidrosolubles y contribuyen a las necesidades diarias (Vollmer *et al.*, 1999). La cáscara está constituida mayoritariamente por carbonato de calcio y tiene un grosor de 0.35 mm aproximadamente y tiene entre 7,000 y 15,000 poros por medio de los cuales se lleva a cabo intercambio de gases con el exterior, contribuye como barrera contra la contaminación hacia el interior del huevo.

## Ovoproductos

El huevo es usado ampliamente en la industria como ingrediente de otros productos alimenticios debido a sus propiedades funcionales, las cuales brindan cualidades organolépticas. Entre éstas destaca su propiedad espumante aplicada en merengues y mousses, su capacidad emulsionante en aderezos y la formación de geles.

La alta demanda de consumo y de uso industrial del huevo ha forzado a implementar nuevas tecnologías para satisfacer las necesidades de una manera más eficiente, es por ello que en los últimos años se ha progresado en la producción de derivados del huevo, también conocidos como ovoproductos, para su uso como materia prima y ofreciendo diferentes presentaciones comerciales para consumo directo.

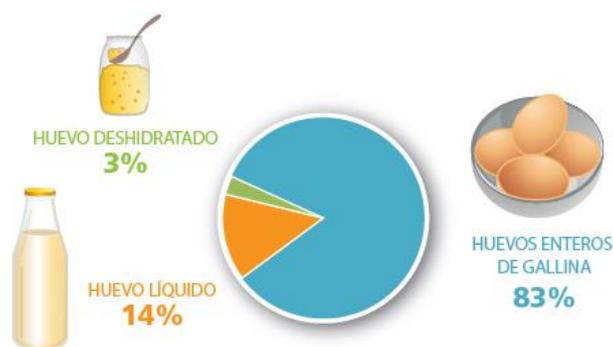
La finalidad del uso de ovoproductos es hacer más efectivo su empleo en procesos, facilitar su manejo, asegurar la inocuidad, disminuir la contaminación cruzada, entre otros.

Los ovoproductos son derivados del huevo en cáscara el cual es procesado para su transformación, entre estos se encuentran principalmente y están definidos según la NOM-159-SSA1-1996 los siguientes:

- **Huevo líquido:** Producto obtenido del huevo, sin cascarón y sometido a pasteurización.
- **Clara líquida:** Producto del huevo sin cascarón al que se le ha eliminado la yema y es sometida a pasteurización.
- **Yema líquida:** Producto obtenido del huevo sin cascarón al que se le ha eliminado la clara y es sometida a pasteurización.

Otro ovoproducto importante es el huevo deshidratado, el cual está definido por la NMX-F-330-S-1979 como el producto en polvo obtenido a partir del huevo fresco o conservado, limpio, sano y revisado a trasluz, elaborado por la eliminación del agua que lo constituye mediante un procedimiento tecnológico adecuado y apto para el consumo humano.

La FAO reporta que el volumen de exportación a nivel mundial de los ovoproductos es 14% para huevo líquido y 3% para huevo deshidratado (Figura 2).



**Figura 2.** Volumen de exportación a nivel mundial en 2011 de huevo entero y ovoproductos. Fuente: FAO, 2011.

El uso del huevo en distintas presentaciones tiene ventajas como: mayor versatilidad, facilidad de empleo, evita el manipular la cáscara reduciendo así mano de obra y tiempo, son de más fácil distribución y almacenamiento, la vida útil es mayor debido a que hay un mejor control de inocuidad por los procesos a los que se han sometido, etc.

El ovoproducto que se utiliza mayormente en la industria de alimentos es el huevo líquido pasteurizado y para obtenerlo, generalmente, primero se lleva a cabo una inspección del huevo en cáscara con el fin de verificar su calidad según la normatividad, posteriormente se lava y sanitiza. La eliminación de la microbiota superficial por cepillado, lavado, desinfección y secado de los huevos va a ayudar reducir la carga microbiana del ovoproducto. Se procede a llevar a cabo el quebrado o rotura de cáscara y una vez separado el producto deseado, ya sea entero, yema o clara, se pasteuriza elevando la temperatura entre 64-65 °C por un periodo de tiempo que va de 2 a 5 min y luego la temperatura desciende a 2

°C. Las condiciones dependen del tipo de producto a obtener, tomando en cuenta las características fisicoquímicas de la materia prima. Finalmente el producto es envasado y se mantiene en refrigeración (4 °C) y en algunos casos es congelado para su almacenamiento (-12 °C). Se pueden adicionar o no aditivos como la goma xantana la cual permite recuperar una parte de las propiedades espumantes perdidas por el tratamiento térmico, además de ingredientes como sal y/o azúcar, entre otros.

El objetivo de la pasteurización es eliminar microorganismos patógenos que pudieran estar presentes dentro de los cuales principalmente se encuentra *Salmonella* que representa el principal riesgo sanitario relacionado con el consumo de huevo. Se han reportado casos de *Salmonella enteritidis* por la ingesta de un producto que contenía huevo pasteurizado (Health Protection Agency, London, 2012), el huevo al ser comercializado líquido permite que el microorganismo presente se rodee de proteína y grasa más fácilmente, lo que aumenta su termorresistencia (Domínguez, 2012). También hay reporte de que algunos microorganismos de los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y algunos bacilos Gram-negativos son los que mayormente sobreviven al proceso de pasteurización (Payne *et al.*, 1979).

### **Microbiota del huevo**

El huevo generalmente es estéril al momento de ser puesto, debido a la función reproductiva que tiene, pero existen dos vías por las cuales se puede contaminar, una de ellas es la vertical o transovárica en la cual el contenido del huevo es contaminado en el proceso de formación en el ovario o por su paso en el oviducto, el microorganismo que se transmite principalmente por esta vía es *Salmonella Enteritidis* ya que coloniza el tracto reproductor de las gallinas (Gantois *et al.*, 2008; Domínguez, 2012). La contaminación más común es por vía horizontal o transcascárida, en ésta intervienen factores externos como las heces de las mismas gallinas que ensucian la cáscara, superficies con las que esté en contacto el producto, manipulación, envase y embalaje, entre otros. La cáscara del huevo es muy porosa lo que provoca que al ser expulsado hacia el exterior hay un cambio de presión y temperatura lo que permite la entrada de

microorganismos que están presentes en la cloaca la cual está en continuo contacto con heces (Mossel *et al.*, 2003).

Cualquier tipo de contaminación del huevo deriva en consecuencias sanitarias y alteraciones en sus propiedades funcionales, la primera es de especial atención ya que puede provocar enfermedades en los consumidores.

### **Patógenos**

En el mundo uno de los principales problemas de salud son las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) (Newman *et al.*, 2015) y el huevo ha sido fuente de brotes que comúnmente se atribuyen a su consumo directo o a alimentos que lo contienen (Howard *et al.*, 2012; Whiley y Ross, 2015), ya que en diferentes productos alimenticios es común usar los huevos crudos, como en pasteles, helados y aderezos, potenciando el riesgo para la salud. Principalmente un huevo contaminado causa salmonelosis que es una infección gastrointestinal y es la ETA's más frecuente en todo el mundo (Keerthirathne *et al.*, 2016). Los agentes causales más frecuentes son *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* (Galís *et al.*, 2013). Pueden estar presentes por contaminación vertical u horizontal procedente de heces. Más del 75% de los casos reportados de salmonelosis son causados por huevos contaminados. Generalmente, la enfermedad causada por *Salmonella* tiene una duración entre 4-7 días, presentando síntomas como diarrea, fiebre y dolor abdominal. La diarrea puede llegar a ser severa poniendo en riesgo la salud del enfermo y representa un riesgo grave en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas (CDC, 2001). Se estima que *Salmonella* es responsable de 80.3 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos (Majowicz *et al.*, 2010) por lo que es un patógeno de especial interés y cuidado. Este género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos, oxidasa y catalasa positivas, además, son capaces de utilizar al citrato como única fuente de carbono y son anaerobios facultativos. Estas características de su metabolismo permiten realizar pruebas bioquímicas para llegar a una identificación. Hay más de 2,600 serotipos identificados de *Salmonella* (Gal-Mor *et al.*, 2014). Otro patógeno entérico que se ha aislado del huevo es *Escherichia coli* (Hope *et al.*, 2002) perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram-negativo

y la principal vía de contaminación es fecal-oral (Elafify *et al.*, 2015). Existen distintas cepas y especialmente la denominada 0157:H7 es causante de diarrea hemorrágica. Los huevos pueden contener *E. coli* extraintestinal y diarreogénica (Grande *et al.*, 2016) debido a contaminación con heces u otro tipo de contaminación ambiental. En un estudio realizado en huevos de granjas comerciales de Australia se aislaron de la superficie de la cáscara 10 cepas de *E. coli* (Chousalkar *et al.*, 2010). La presencia de este microorganismos es un indicador de mala higiene (Kornacki y Johnson, 2001).

El género *Staphylococcus* está conformado por cocos Gram-positivos y producen enterotoxinas termoestables, se encuentra distribuido en el medio ambiente e incluso está presente en la piel, fosas nasales y cabello. Por lo mismo, es fácil que puedan transmitirse a los ovoproductos sobre todo si no se llevan a cabo buenas prácticas de higiene o el equipo industrial en donde se procesa el huevo está contaminado y no es sanitizado correctamente. En un estudio realizado en 1,125 muestras dentro de las cuales se incluye clara, yemas y cáscaras de huevo, se encontró presencia de estafilococos en 514 casos, destacando su presencia en la yema y con mayor incidencia en la cáscara. Se aislaron las siguientes especies: *S. aureus*, *S. hycus*, *S. lentus*, *S. warneri*, *S. epidermis* y *S. xylosus* (Stepień-Pyśniak *et al.*, 2009).

Otros patógenos, como *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, ocasionalmente suelen estar asociados con los huevos y ovoproductos (Downes e Ito, 2001). Es muy poco frecuente, aunque su propagación a partir de la cáscara y del equipo de las plantas de procesado es posible. Por ejemplo, en Assiutcity, Egipto, se analizaron 300 huevos de mesa, en donde se identificó mediante PCR, la presencia de *L. monocytogenes* en un 7% de las cáscaras de las muestras (Sayed *et al.*, 2009).

### **Microorganismos de descomposición**

Se han identificado distintos géneros bacterianos que tienen la capacidad de penetrar en el huevo, crecer en él y causar alteraciones como putrefacción y cambios organolépticos, algunos de los reportados se muestran a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Géneros bacterianos aislados de huevos en estado de putrefacción

<b><i>Pseudomonas</i></b>	<b><i>Enterobacter</i></b>
<b><i>Acinetobacter</i></b>	<b><i>Serratia</i></b>
<b><i>Proteus</i></b>	<b><i>Alcalígenes</i></b>
<b><i>Aeromonas</i></b>	<b><i>Bacillus</i></b>
<b><i>Flavobacterium</i></b>	<b><i>Staphylococcus</i></b>

Fuente: Gil y Ruíz, 2010.

Los microorganismos asociados con más frecuencia al deterioro son bacilos Gram-negativos como *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Escherichia coli* y *Serratia* (Mossel *et al.*, 2003).

En 2003, se reportaron 18 casos de infección por *S. typhimurium* los cuales fueron relacionados con el consumo de un producto que contenía huevo procesado para ensaladas (CDC, 2004). Entre abril y agosto del 2016, en E.UA., la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) reportó 52 casos de personas enfermas que habían consumido huevo en cáscara. Para realizar la identificación del agente causante se emplearon las técnicas de electroforesis en gel de campo pulsado y secuenciación de genoma completo. Se determinó que los brotes fueron originados por una cepa de *Salmonella oranienburg*. Se realizó un rastreo y se encontró que las diferentes cepas aisladas estaban relacionadas genéticamente con muestras encontradas en una planta de procesamiento de huevo por lo que se tuvo que retirar el producto de distintos puntos del país (CDC, 2016; FDA, 2016). *Salmonella* puede sobrevivir a la cocción inadecuada de los huevos (Keller *et al.*, 1997). Cada año en E.U.A. se presentan alrededor de 1.3 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos y los huevos contaminados han sido implicados como vehículo importante en los casos de salmonelosis (CDC, 2004).

El huevo es un producto perecedero, por lo que es indispensable cuidar desde el momento de su puesta hasta que está en manos del consumidor. La presencia de distintos microorganismos en huevo y ovoproductos deriva en la importancia de realizar una identificación microbiológica y buscar alternativas de inhibición

de dichos microorganismos presentes para así asegurar su inocuidad, además de mantener su vida útil por mayor tiempo.

### **Técnicas de identificación de microorganismos**

Existen diversos métodos para identificar microorganismos y se pueden clasificar en dos grupos, los cuales se muestran a continuación:

#### ***Dependientes de cultivo***

Este tipo de identificación se basa en las características fenotípicas, es decir, las que pueden observarse como la morfología, movilidad, Gram, propiedades bioquímicas (catalasa, oxidasa, fermentación de glucosa, entre otras) y para esto previamente se debe tener un cultivo del microorganismo, lo que nos limita a identificar solamente células viables, además de que únicamente entre 0.1 y 10% de los microorganismos en el ambiente son cultivables (Handelsman *et al.*, 2002). Este tipo de técnicas no brindan certeza absoluta, solamente se indica el género y/o la especie a la que probablemente pertenece el microorganismo en cuestión (Bou *et al.*, 2011), son ampliamente usadas ya que representan un menor costo y son accesibles. Se usan diferentes medios de cultivo selectivos, por lo que es necesario hacer una correcta elección de éstos y de las condiciones de incubación dependiendo del microorganismo y muestras a trabajar.

Según la NOM-159-SSA1-1996 para huevo y ovoproductos, la determinación de microorganismos como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y enterobacterias se realiza a partir de métodos tradicionales de microbiología utilizando medios de cultivo selectivos, teniendo limitaciones ya que al basarse en características observables no pueden tomarse como un método de identificación definitivo, una misma cepa no genera características iguales en ensayos repetidos (Bou *et al.*, 2011). Debido a estas desventajas e inconvenientes que presentan estas técnicas se recurre a utilizar conjuntamente métodos moleculares que permitan una identificación genotípica completa, certera y que además no dependen de un cultivo.

### ***Independientes de cultivo***

La identificación independiente de cultivo emplea técnicas de biología molecular y permite hacer análisis de la diversidad bacteriana extrayendo ADN directamente del alimento (Gómez, 2010). En los últimos años se ha aplicado la amplificación mediante PCR y la secuenciación de genes con el fin de caracterizar microorganismos a partir de un cultivo o directamente de muestras. Estas técnicas han llevado a una identificación de diferentes patógenos y así han permitido una mejor clasificación de los mismos. Este tipo de métodos son más objetivos y precisos que los utilizados convencionalmente (Petti, 2007).

### ***Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)***

La PCR es una herramienta ampliamente utilizada para hacer copias de un fragmento específico de ADN, para realizarla se necesita ADN molde o templado que contiene la secuencia específica que se desea amplificar. Es indispensable el uso de cebadores que son secuencias conocidas, éstas se unen en su sitio complementario en cada extremo de la región de interés y tienen la función de ser el punto de partida para iniciar la síntesis. También se necesitan nucleótidos libres para construir las nuevas cadenas de ADN y una ADN polimerasa que sea resistente al calor.

Se llevan a cabo tres pasos que se repiten cíclicamente, el inicial es la desnaturalización de la molécula de ADN, es decir, la separación de sus cadenas, lo cual se realiza aumentando la temperatura a 95 °C con el fin de que cada cadena sirva como molde para sintetizar una nueva. En el segundo paso la temperatura es reducida a 55 °C lo que permite la unión de los cebadores con la secuencia que les complementa. En la tercera etapa, la temperatura es elevada alrededor de los 72 °C y la ADN polimerasa comienza la adición de nucleótidos en los extremos de los cebadores, sintetizando así las nuevas cadenas.

El ADNr 16S es el más utilizado para estudios taxonómicos de procariontes ya que es conservado con funciones constantes (Bottger, 1989; Gómez, 2010). Tiene un tamaño de aproximadamente 1,500 pares de bases (Clarridge, 2004) y a partir de esta secuencia se obtiene información con la cual se establecen relaciones filogenéticas entre procariontes en una base de datos, lo que da lugar

a una identificación molecular precisa y reproducible (Rodicio y Mendoza, 2004; Petti, 2007). Mediante esta técnica se pueden identificar patógenos y bacterias no cultivables (Clarride, 2004).

## ANTECEDENTES

### Inhibición de microorganismos en huevo

El huevo cuenta con barreras físicas y químicas que lo protegen de contaminación microbiana (Ismail *et al.*, 2014), entre ellas se encuentra la ovomucina, proteína que forma parte del albumen denso, y la cual frena la difusión de los microorganismos, la cutícula que recubre los poros de la cáscara y otras barreras de tipo químico y biológico como la lisozima, transferrina, avidina y flavoproteína. Por la presencia de estas defensas se puede explicar el por qué la contaminación del huevo es de origen exterior habitualmente y rara vez se contamina la yema.

Sin embargo, a pesar de dichas barreras naturales los huevos son contaminados microbiológicamente por factores ambientales y en el caso de los ovoproductos puede ser por el equipo con el cual se lleva a cabo el proceso. Por lo que es necesario implementar el uso de otros métodos para inhibir a la microbiota presente.

### *Físicos*

Hay procedimientos físicos para eliminar a los microorganismos del huevo, los más comunes son los siguientes:

#### *Lavado*

El lavado es importante, se realiza antes de la utilización del huevo en la línea de producción. Primero se lleva a cabo un cepillado y el uso de algún agente sanitizante. En investigaciones se ha indicado que los sistemas de lavado y desinfección de las cáscaras que se emplea industrialmente no elimina por completo a los microorganismos presentes en la superficie (Al-Ajeeli *et al.*, 2016), por lo que es necesario utilizar alguna otra alternativa para lograr reducir la carga microbiana y así los riesgos de contaminación.

#### *Secado*

La deshidratación de huevo líquido puede llevarse a cabo empleando torres de atomización horizontales en los cuales el producto es sometido a una corriente

de aire filtrado a una temperatura de 160 °C en el caso de la albumina y de 180 °C para la yema. En algunas ocasiones, el huevo se somete a un proceso previo de eliminación de la glucosa con el fin de evitar que se lleve a cabo pardeamiento del producto provocado por reacciones de Maillard.

### *Pasteurización*

Un tratamiento térmico importante y que se mencionó con anterioridad es la pasteurización, que es ampliamente usado en la obtención de ovoproductos. Consiste en elevar la temperatura arriba de los 60 °C manteniéndola por 4.5 min y finalmente bajar la temperatura a 2 °C.

### *Empaque al vacío*

Método de envasado que consiste en retirar el aire de un empaque mediante una bomba de vacío.

### **Químicos**

#### *Solución electrolizada de superoxidación (SES)*

La solución electrolizada de superoxidación (SES) es un germicida que se obtiene a través de un proceso electroquímico a partir de agua desionizada y cloruro de sodio donde se generan iones estables controlados.

Se usa para la desinfección de superficies, artículos y alimentos. Se tiene reporte de que se empleó para la inhibición de *Pseudomonas spp.* en lechuga fresca, cortadas y almacenada en frío, con una concentración de 200 mg/L de cloro libre, durante 2 min a 4 °C, observando que se reducía un log/g a este microorganismo (Pinto, *et al.*, 2015).

La solución de agua electrolizada de oxidación con pH ácido se reporta como una alternativa potencial para la inhibición de microbiota en alimentos (Cao, *et al.*, 2009) ya que ha demostrado tener una actividad bactericida en distintos patógenos como *Escherichia coli* O157: H7 (Venkitanarayanan, *et al.*, 1999; Ozer y Demirci, 2006) y *Salmonella enteritidis* (Fabrizio *et al.*, 2002), los cuales son los dos microorganismos con más incidencia en huevo, por lo que la SES tiene potencial para emplearse con el fin de inhibir a estas bacterias en ovoproductos.

## **Naturales**

### *Bacterias ácido lácticas*

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram-positivas, catalasa y oxidasa negativos, no esporulados, toleran pH ácido, anaeróbios, microaerofílicos o aerotolerantes (Carr *et al.*, 2002) son utilizadas en distintos alimentos, entre ellos destaca su uso en productos lácteos fermentados y cárnicos, son denominadas como GRAS (Generally Recognized As Safe) y contribuyen a las propiedades organolépticas de algunos alimentos. Este conjunto de microorganismos son utilizados como bioconservadores ya que inhiben el desarrollo de patógenos y de bacterias relacionadas con la descomposición (García-Cano, 2013). Algunas cepas de BAL destacan por su efecto inhibitorio que han presentado contra microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (García-Cano *et al.*, 2014).

El interés en las BAL se debe a su efecto conservador y a los reportes que tienen de actividad antimicrobiana dada por la producción de ácidos orgánicos, como el láctico y acético, además de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas (PGH).

En el laboratorio S-132 de la UAM unidad Iztapalapa se cuenta con un grupo de bacterias que se han reportado como productoras de bacteriocinas y PGH. Estas cepas han sido probadas como bioconservadores en diversos productos alimenticios logrando aumentar su vida de anaquel y contribuyendo a su inocuidad. Hasta el momento, no existen reportes del empleo estas cepas y de las proteínas que producen con actividad antibacteriana como bacteriocinas y PGH sobre la vida de útil del huevo.

## **HIPÓTESIS**

Los compuestos con actividad antimicrobiana producidos por las bacterias ácido lácticas y el uso de una solución electrolizada de superoxidación tendrán la capacidad de inhibir a la microbiota presente en huevo procesado y alargar su vida de anaquel.

## **OBJETIVOS**

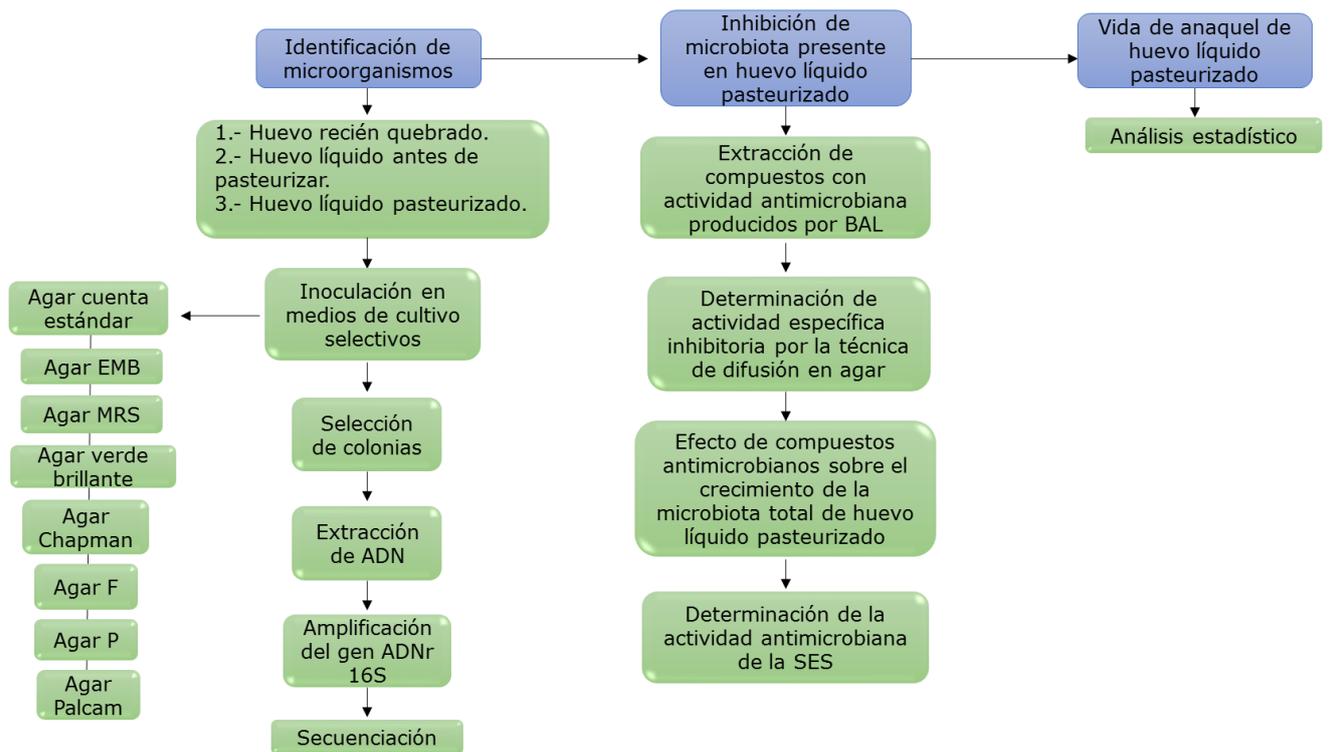
### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar la microbiota presente en muestras de huevo procesado utilizando métodos tradicionales de microbiología en combinación con métodos moleculares. Así mismo, evaluar la inhibición de dicha microbiota utilizando compuestos antimicrobianos con la finalidad de alargar la vida de anaquel del producto.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar a los microorganismos presentes en muestras de huevo procesado mediante técnicas tradicionales de microbiología y métodos de biología molecular.
- Evaluar la actividad específica inhibitoria de compuestos producidos por bacterias ácido lácticas contra microorganismos aislados de huevo entero líquido pasteurizado.
- Determinar el efecto inhibitorio de una solución electrolizada de superoxidación sobre microorganismos presentes en huevo entero líquido pasteurizado.
- Estimar la vida de anaquel del huevo entero líquido pasteurizado utilizando distintos tratamientos en los que se emplean los compuestos con actividad inhibitoria.

## METODOLOGÍA



**Figura 3.** Diagrama general de trabajo

### Obtención de muestras

El huevo fue proporcionado por la empresa Alimentos Deshidratados S.A. de C.V. ubicada en H. Galeana Núm. 5 esquina Av. del canal Fracc. Industrial el Moral, Iztapalapa. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en una hielera a 4 °C.

Se trabajó con tres muestras obtenidas a partir de distintos puntos del proceso que lleva a cabo la empresa:

1.- Huevo líquido recién quebrado

2.- Huevo entero líquido antes de pasteurizar almacenado en tanque

3.- Huevo entero líquido pasteurizado

### **Acondicionamiento de la muestra**

En campana de flujo laminar se pesaron 25 g de cada muestra, se colocaron por separado en una bolsa Ziploc®, se le adicionaron 225 mL de solución salina estéril (0.85%, pH=7) y se homogeneizó en un Stomacher (Stomacher® 400 Circulator, UK). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en tubos estériles de 1.5 mL.

### **Preparación de medios de cultivo**

Se elaboraron placas de los siguientes medios de cultivo de acuerdo al método de preparación especificado para cada uno: agar verde brillante (AVB, BD Bioxon), agar cuenta estándar (CE, BD Bioxon), agar Chapman (ACH, Merck), agar MRS (Difco) con verde de bromocresol, agar EMB (BD Bioxon), agar Palcam (Difco), agar P (AP, Difco) y agar F (AF, Difco).

### **Inoculación en medios de cultivo selectivos**

A partir de las diluciones se inocularon 100 µL por duplicado en cada placa del medio selectivo. Para homogeneizar el inóculo se agregaron de tres a cuatro perlas de vidrio estériles realizando movimientos circulares. Se incubaron de 24 h a 37 °C.

### **Selección de colonias**

De las cajas que tuvieron crecimiento se realizó una selección de las que eran diferentes entre sí respecto a sus características morfológicas. Éstas se picaron con un palillo estéril y se inoculó en un tubo de ensaye con 5 mL de medio de cultivo líquido BHI (Brain Heart Infusion, Difco) y en caldo MRS (Difco) para las que crecieron en agar MRS, se incubaron a 37 °C por 24 h.

### **Tinción de Gram**

Posteriormente se realizó una tinción de Gram, primer se llevó a cabo el frotis bacteriano a partir del cultivo líquido, se fijó con calor y se agregó cristal violeta cubriendo el frotis dejándolo actuar por un min. Se lavó con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante, después, se añadió el lugol, dejando actuar un min. Se lavó con agua. Se decoloró con alcohol/acetona hasta que el efluente

se observó incoloro. Se lavó con agua. Finalmente, se agregó safranina cubriendo el frotis y se dejó un min. Se lavó con agua y se dejó secar el portaobjetos con la preparación a temperatura ambiente. Se observó al microscopio (Velab microscopes VE-146 YT, E.U.A.) con el objetivo de 100x.

### **Extracción de ADN genómico**

De cada uno de los tubos en los cuales se crecieron las colonias seleccionadas se tomaron 50  $\mu$ L y se adicionaron a tubos con 5 mL de medio líquido BHI o MRS para las colonias que crecieron en agar MRS. Se incubaron a 37 °C por 12 h. Una vez obtenido el crecimiento se realizó el método reportado por García-Cano en 2014; se tomaron 1.5 mL del cultivo y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min en una centrifuga (Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemania) y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se lavó el pellet con 1 mL de sacarosa 10.3% (la cual se emplea para ejercer una presión osmótica y así lisar a las células), se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Al pellet obtenido se le adicionó 1 mL de buffer SET (Tris 50 mM pH= 8, EDTA 50 mM y sacarosa 20%; el EDTA es un agente quelante de cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$ , dado que éste es un cofactor requerido por la mayoría de nucleasas, su secuestro por el EDTA evita la degradación del DNA durante la preparación), 100  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL; enzima que hidroliza los enlaces glucosídicos  $\beta(1-4)$  del polímero de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico que constituye la pared celular de las bacterias) y 10  $\mu$ L de ARNasa (10 mg/mL; enzima que hidroliza ARN), se mezcló y se incubó a 37 °C por 60 min con una agitación de 50 rpm (Incubadora orbital Prendo INO 650V-9, Puebla, México). Posteriormente se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió perfectamente el pellet en 200  $\mu$ L de sacarosa 10.3% y después se agregaron 5  $\mu$ L de EDTA 0.5 M, 80  $\mu$ L de SDS 10% (detergente que se emplea para romper la membrana celular), se mezcló bien y se añadieron 300  $\mu$ L de NaCl 5 M, se agitó hasta que todo se incorporara perfectamente y se incubó a 4 °C por 30 min. A continuación se centrifugó a 14,000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se recuperó en un tubo de 1.5 mL limpio y estéril. El ADN es separado de los contaminantes precipitándolo con 800  $\mu$ L de isopropanol, se agitó y se incubó a temperatura ambiente toda la noche. Una vez pasado este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante, se

lavó el pellet dos veces con 800 µL de etanol 70% y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el ADN se eluyó con 50 µL de Tris 50 mM y se calentó a 50 °C por 15 min. El ADN extraído de cada colonia seleccionada se evaluó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Biorad®, 0.001%) para verificar la integridad del mismo, se visualizó en un Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System, Bio Rad.

### **Amplificación del gen de referencia ADNr 16S**

Para realizar la amplificación del gen 16S se utilizaron los cebadores y las condiciones reportadas por García-Cano en 2014: fD1 (Forward) 50CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30 y rD1 (Reverse) 50CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-30). Para cada reacción de PCR se usaron 100 ng de ADN extraído de cada una de las cepas, en un volumen final de 50 µL con 2.5 U de *Pfu* DNA polimerasa (Thermo Scientific), de cada cebador se utilizó 0.4 mM y 2.5 mM de MgSO<sub>4</sub>. Se llevó a cabo 1 ciclo a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 2 min, 42 °C por 30 s, 72 °C por 4 min y finalmente un ciclo a 72 °C con una duración de 10 min en un termociclador (Eppendorf Mastercycler, Hamburgo, Alemania). Una vez obtenidos los amplicones de aproximadamente 1,500 pb se purificaron con el kit PCR High Pure (Roche Applied Science).

### **Secuenciación**

Se mandó a secuenciar a MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Una vez recibidos los resultados, las secuencias se analizaron mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI).

### **Extracción de compuestos con actividad antimicrobiana producidos por BAL**

Se emplearon BAL de distintas procedencias y que previamente han sido reportadas con actividad antibacteriana, las cuales se mencionan a continuación:

- *Pediococcus acidilactici* MXVK133 (reportado por Schneider Schanzenbach, tesis de doctorado, UAM, 2005).

- *Enterococcus faecium* MXVK29 (reportado por López Arvizu, tesis de maestría, UAM, 2015).
- *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium* (reportados por Salas Villagrán, tesis de licenciatura en proceso, UNAM, 2016).

En matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de Caldo Glucosa Caseína (CGB) se inoculó individualmente el 1% de los siguientes microorganismos: *Pediococcus acidilactici* MXVK133, *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Lactobacillus plantarum*. Se incubaron en condiciones estáticas por 8 h a 37 °C. La cepa de *Enterococcus faecium* se inoculó al 1% en 50 mL de caldo MRS (Difco) con agitación por 8 h a 37 °C. Una vez obtenido el crecimiento se centrifugaron por 10 min a 14,000 rpm a 4 °C. Se obtuvo el extracto crudo libre de células el cual se llevó a pH 7.0, finalmente se esterilizó por filtración con una membrana de 0.45 µm (Millipore) y el pellet celular se suspendió en 2 mL de solución salina estéril (García-Cano *et al.*, 2014).

### **Cuantificación de proteína**

Se cuantificó proteína de los extractos libres de células por el método de Bradford (1976) empleando un kit comercial (Bio-Rad) y una curva patrón de albúmina bovina sérica en un lector de placas (BioTek modelo Synergy HT, Vermont, E.U.A.) a una longitud de onda de 595nm.

### **Determinación de la actividad específica inhibitoria por la técnica de difusión en agar**

Se colocaron 20 mL de agar BHI al 1.5% (m/v) en placas Petri y se solidificó a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 20 mL de agar BHI 0.8% (m/v) previamente inoculado con 2 µL de cada una de las cepas aisladas a partir de huevo líquido pasteurizado. Se hicieron pozos sobre las placas con el extremo de una pipeta Pasteur y se añadieron 200 µL de los diferentes extractos crudos obtenidos con anterioridad de las cepas: *P. acidilactici* MXVK133, *E. faecium* MXVK29, *L. plantarum* y *E. faecium*. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. El ensayo se consideró positivo al observarse halos de inhibición mayores a 1 mm y se correlacionó con la cantidad de proteína total en cada pozo (García-Cano, 2013).

## **Efecto de compuestos antimicrobianos sobre el crecimiento de la microbiota total de huevo entero líquido pasteurizado**

De las cepas *P. acidilactici* MXVK133, *L. plantarum* y *E. faecium* se realizó una reactivación y extracción de proteína bajo las mismas condiciones que se explicaron anteriormente.

A partir de una caja Petri con agar cuenta estándar en la cual se inoculó la muestra de huevo líquido pasteurizado y se obtuvo crecimiento, se realizó un barrido con un asa estéril y se sembró en un tubo con 5 mL de caldo BHI (Difco), se dejó incubar por 12 h a 37 °C. Posteriormente se adicionó el 1% de este inóculo a cinco matraces con 50 mL de caldo BHI cada uno, los cuales se incubaron a 37 °C. De éstos se tomaron alícuotas de 1 mL cada 30 min y se les midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (Varian 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer, Agilent Technologies, Santa Clara, E.U.A.), cuando se observó que se estaba en la fase logarítmica de crecimiento, se adicionaron los mL necesarios de extracto crudo producido por cada BAL para tener 2 mg de proteína, a otro matraz se le agregaron 10 mL de SES 60 ppm y un último matraz se utilizó como control para observar el crecimiento de la microbiota. Se siguió incubando y se monitoreó la  $DO_{600\text{ nm}}$  por 6 h.

## **Determinación de la actividad antimicrobiana de la SES según la NMX-BB-040-SCFI-1999**

Para evaluar el efecto que tiene la SES sobre la microbiota del huevo líquido pasteurizado se siguió lo establecido por la NMX-BB-040-SCFI-1999 para la determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.

Primero, se reactivó la microbiota total de huevo pasteurizado añadiendo 50  $\mu$ L en 5 mL de caldo BHI dejando incubar a 37 °C por 12 h. Posteriormente, se tomaron 50  $\mu$ L de éste y se agregaron a un tubo con 5 mL de solución salina estéril (0.85%), se midió la transmitancia y una vez que se encontrara entre 3-5 se inoculó el 1% en un vaso de precipitados estéril con 10 mL de SES (60 ppm), en otro con 10 mL de SES (30 ppm) y en un último con 10 mL de solución salina estéril (0.85%) (Cuenta viable inicial). Se dejaron en contacto durante 30 s y después se tomaron 100  $\mu$ L de cada uno y se inocularon en cajas Petri con agar

cuenta estándar. También se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , las cuales fueron inoculadas en caja. Se incubaron a 37 °C por 12 h. Pasado este tiempo se contaron las UFC presentes por mL.

Se calculó el porcentaje de reducción de la SES en concentración 60 y 30 ppm de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.}$$

S: Células sobrevivientes (UFC/mL)  
C.V: Cuenta viable inicial

### Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado

Se evaluó la vida de anaquel de huevo entero líquido pasteurizado en la cual se utilizaron las siguientes condiciones:

- **SES 60 ppm.** Se agregaron 2.5 mL por aspersion en una bolsa de empaque y luego se agregaron 200 mL de la muestra.
- **SES 30 ppm.** Se agregaron 2.5 mL por aspersion en una bolsa de empaque y luego se agregaron 200 mL de la muestra.
- **SES 10 ppm.** Se añadió el 1% directo en 200 mL de muestra bolsa de empaque.
- **Extracto crudo libre de células de *Pediococcus acidilactici* MXVK133.** Se agregaron 2.5 mL por aspersion en 200 mL de muestra contenida en una bolsa de empaque.
- **Extracto crudo de *Pediococcus acidilactici* MXVK133.** Se agregaron 2.5 mL por aspersion en una bolsa de empaque, luego se agregaron 200 mL de muestra.
- **Empaque al vacío y SES.** Se agregaron por aspersion 2.5 mL de SES 30 ppm en una bolsa con 150 mL de muestra y se empacó al vacío.
- **Empaque al vacío.** Se agregaron 150 mL de muestra en una bolsa y se empacó al vacío.
- **Control.** 200 mL de muestra en bolsa de empaque.

Las bolsas utilizadas para el empaque, eran estériles y con dimensiones de 18.5x29 cm. Cada una de las bolsas se amarró con un nudo y se almacenó a 4 °C.

Para los días 0, 1, 3, 6, 9, 12 y 15 de la vida de anaquel se tomaron 25 g de muestra de cada una de las condiciones descritas anteriormente, se agregaron 225 mL de solución salina (0.85%) y se homogeneizaron en Stomacher, se tomaron 100  $\mu$ L y se inocularon en agar cuenta estándar y en agar EMB. También se realizaron diluciones seriadas de las cuales se inoculó y se dejaron en incubación a 37 °C por 24 h.

La estimación de vida de anaquel se realizó acorde con el método simplificado, que consistió en un análisis de regresión lineal del logaritmo de cada variable de respuesta durante el tiempo de almacén y el tiempo para alcanzar los valores límite, considerando una cinética de primer orden y extrapolación a condiciones estándares de refrigeración.

$$\text{Log}(V_R) = \mu(\text{tiempo}) + \beta$$

### **Determinación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )**

A partir de los datos de la población microbiana (UFC/g) y el tiempo de crecimiento durante los días de la vida de anaquel, se obtuvieron las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) para mesófilos y enterobacterias de cada tratamiento estudiado, utilizando el software ComBase 2017.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis de resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método de Duncan para la comparación de medias entre tratamientos y se realizó un análisis de componentes principales, para lo cual se empleó el paquete estadístico XLSTAT-Base (2016).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

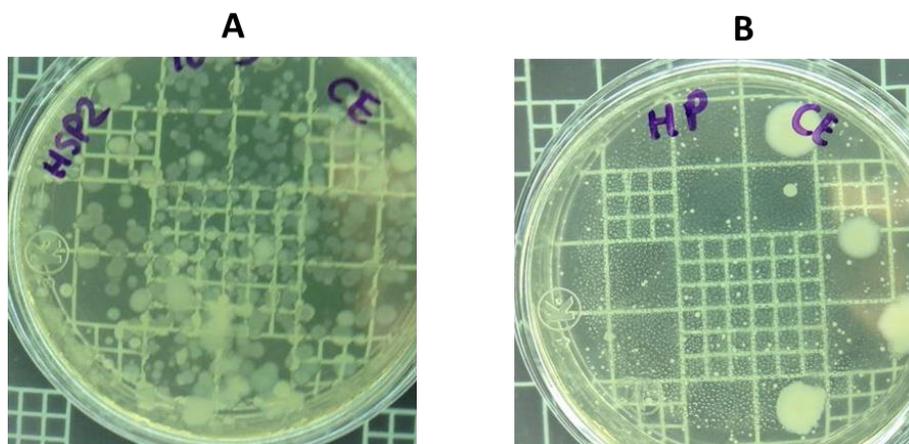
### Selección de colonias en medios de cultivo

A partir de las muestras de huevo recién quebrado, huevo entero líquido antes de pasteurizar y el pasteurizado, se sembró en diferentes medios de cultivo y de las colonias que crecieron se realizó una descripción morfológica seleccionando las que tenían características diferentes. Los resultados se muestran a continuación:

**Huevo recién quebrado:** No se presentó crecimiento de microorganismos en ninguno de los medios de cultivo utilizados, ya que el huevo al ser una estructura destinada a permitir el desarrollo de un embrión es un ambiente estéril (Domínguez Pineda, 2012).

### Agar Cuenta Estándar

En el agar cuenta estándar se realizó el recuento de microorganismos aerobios mesófilos presentes. En la muestra de huevo entero líquido antes de ser pasteurizado se obtuvo un valor de 9.60 log (UFC/g). Una vez realizada la pasteurización la carga microbiana fue disminuida a 4.45 log (UFC/g). Este efecto de reducción puede observarse en la Figura 4.



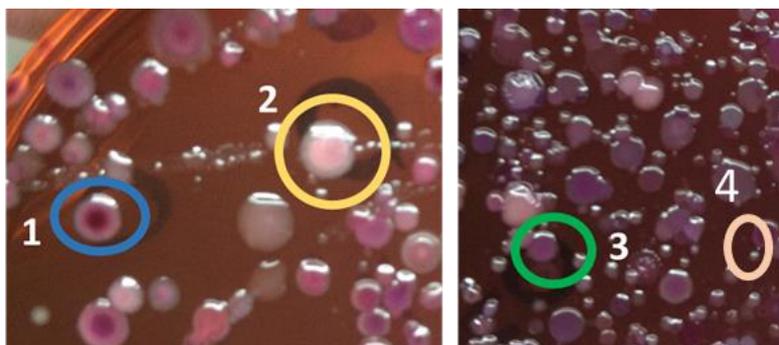
**Figura 4.** Agar Cuenta Estándar. A: Huevo entero líquido antes de pasteurizar. B: Huevo entero líquido pasteurizado.

## Agar EMB

El agar EMB permite el desarrollo de enterobacterias y microorganismos Gram-negativos y posibilita el diferenciar entre microorganismos fermentadores de lactosa y los no fermentadores debido a que contiene eosina y azul de metileno los cuales, además, tienen un efecto inhibitorio sobre bacterias Gram-positivas. En la muestra de huevo entero líquido antes de pasteurizar se observaron colonias que tenían diferente morfología entre sí por lo que fueron seleccionadas para su posterior identificación (Tabla 3, número 1-3; Figura 5). En la muestra de huevo líquido pasteurizado se presentó un menor crecimiento, sin embargo, se observó una colonia con características diferentes a las obtenidas anteriormente por lo que se eligió para identificar qué microorganismo es el que está sobreviviendo al proceso de pasteurización (Tabla 3, número 4).

**Tabla 3.** Colonias seleccionadas en agar EMB con sus características morfológicas y Gram

Número	Morfología colonial	Gram	Morfología al microscopio
<b>Muestra: Huevo entero líquido antes de pasteurizar</b>			
1	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> morado con centro negro	Negativo	Bacilos
2	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> rosa con halo blanco	Positivo	Cocos
3	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> morado	Negativo	Bacilos
<b>Muestra: Huevo entero líquido pasteurizado</b>			
4	<b>Forma:</b> puntiforme <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanquecino	Positivo	Cocos



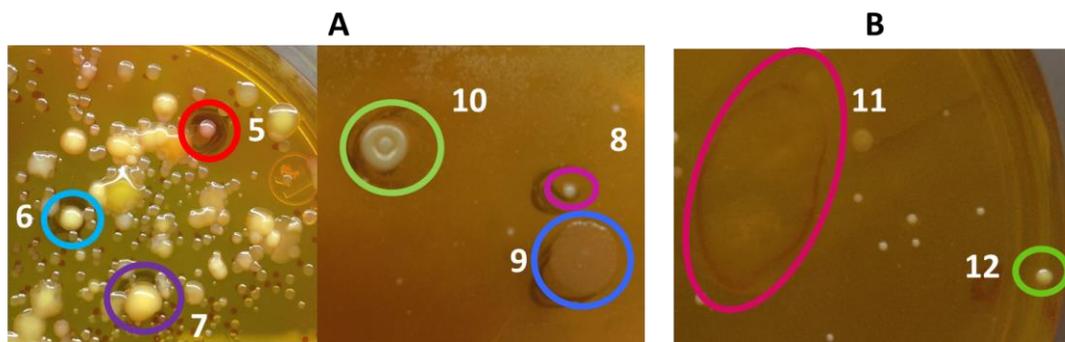
**Figura 5.** Colonias seleccionadas en agar EMB. Colonias 1-3, provenientes de huevo entero líquido antes de pasteurizar. Colonia 4, se presentó tanto en huevo líquido antes de pasteurizar y pasteurizado.

### Agar Verde Brillante

El agar verde brillante (AVB) es utilizado para el aislamiento selectivo de *Salmonella*, la NOM-159-SSA1-1996 en su método para la determinación de este microorganismo establece el uso de este medio. Las características que presenta son colonias de color rojo o rosas que pueden llegar a ser transparentes rodeadas por medio enrojecido. Las bacterias que son fermentadoras de la lactosa presentan colonias de color amarillo, debido a que el medio contiene rojo de fenol como indicador de pH el cual vira a amarillo en presencia de ácido. Además, el verde brillante actúa como un agente selectivo. En la muestra de huevo líquido antes de pasteurizar se observaron colonias que típicamente corresponden al crecimiento de *Salmonella*, su descripción se muestra en la Tabla 4. Por otra parte, también se obtuvieron colonias que no tienen las características morfológicas típicas, tanto en huevo antes y después de ser pasteurizado, de igual manera se trabajó con estas colonias para realizar su identificación y así tener un panorama más amplio de toda la microbiota presente. Cabe resaltar que en el huevo pasteurizado no hubo crecimiento de colonias típicas (Tabla 4, Figura 6).

**Tabla 4.** Colonias seleccionadas en agar verde brillante con sus características morfológicas y Gram

Numero	Morfología colonial	Gram	Morfología al microscopio
<b>Muestra: Huevo entero líquido antes de pasteurizar</b>			
5	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> rosa Medio enrojecido	Positivo	Cocos
6	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco opaco	Negativo	Bacilos
7	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> amarillo brillante	Positivo	Cocos
8	<b>Forma:</b> puntiforme <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco opaco	Positivo	Cocos
9	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> ondulado <b>Elevación:</b> plana <b>Color:</b> blanco	Positivo	Cocos
10	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> plana <b>Color:</b> blanco	Positivo	Bacilos
<b>Muestra: Huevo entero líquido pasteurizado</b>			
11	<b>Forma:</b> amiboide <b>Borde:</b> lobulado <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> translucido	Positivo	Cocos
12	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> amarillo opaco	Positivo	Cocos



**Figura 6.** Colonias seleccionadas en agar verde brillante. A: Colonias 5-10, provenientes de huevo entero líquido antes de pasteurizar. B: Colonias 11 y 12, provenientes de huevo entero líquido pasteurizado.

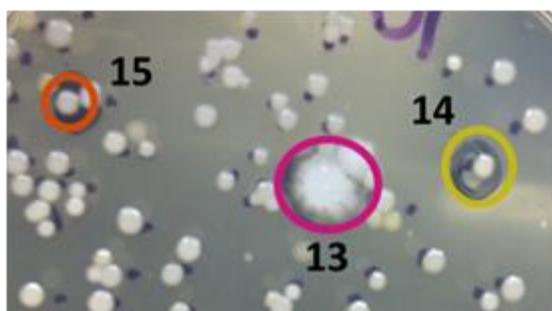
### Agar Chapman

El agar Chapman es un medio selectivo para estafilococos que contiene una concentración alta de cloruro de sodio actuando como agente selectivo y presenta típicamente colonias amarillas.

Se encontraron tres colonias diferentes en huevo antes de pasteurizar descritas en la Tabla 5. Para huevo pasteurizado no hubo crecimiento de colonias amarillas típicas de estafilococos, sólo se presentaron colonias blancas (Tabla 5; Figura 7).

**Tabla 5.** Colonias seleccionadas en agar Chapman con sus características morfológicas y Gram

Número	Morfología colonial	Gram	Morfología al microscopio
<b>Muestra: Huevo entero líquido antes de pasteurizar</b>			
13	<b>Forma:</b> amiboide <b>Borde:</b> lobulado <b>Elevación:</b> convexa rugosa <b>Color:</b> blanquecino	Positivo	Cocos
14	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> amarillo	Positivo	Cocos
15	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> plana <b>Color:</b> blanco	Positivo	Cocos



**Figura 7.** Colonias 13-15 seleccionadas en agar Chapman provenientes de huevo entero líquido antes de pasteurizar.

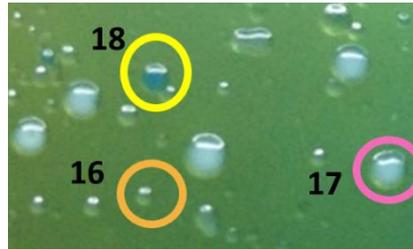
### Agar MRS

El agar MRS es utilizado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas las cuales presentan generalmente un tamaño pequeño y un color que va del blanco al gris. Este medio de cultivo contiene citrato de amonio, el cual actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram-negativas.

Hubo desarrollo de tres colonias diferentes en huevo antes de pasteurizar (Tabla 6; Figura 8). En huevo pasteurizado no se observaron colonias distintas a las ya descritas y no se presentaron colonias de color verde.

**Tabla 6.** Colonias seleccionadas en agar MRS con sus características morfológicas y Gram

Número	Morfología colonial	Gram	Morfología al microscopio
<b>Muestra: Huevo entero líquido antes de pasteurizar</b>			
16	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> gris translucido	Positivo	Cocos
17	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco opaco	Positivo	Cocos
18	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> verde	Positivo	Cocos



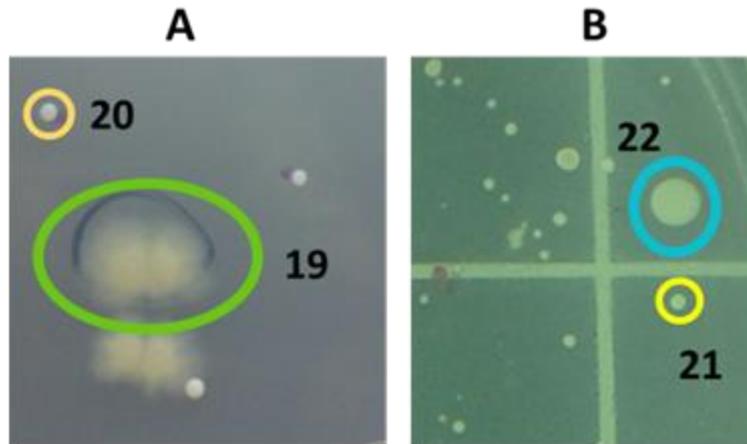
**Figura 8.** Colonias 16-18 seleccionadas en agar MRS provenientes del huevo entero líquido antes de pasteurizar.

### Agar P

El agar P (AP) es un medio de cultivo que se utiliza para la detección de *Pseudomonas spp.* está fundamentado en la producción de pirocianina la cual cuando es positiva presenta un color azul-verdoso que rodea a la colonia y también puede o no haber producción de piorrubina en la cual se observa un color rojo. Ninguna de las colonias presentó tales características típicas, aun así se aislaron las colonias morfológicamente diferentes para ser identificadas (Tabla 7; Figura 9).

**Tabla 7.** Colonias seleccionadas en agar P con sus características morfológicas y Gram

Número	Morfología colonial	Gram	Morfología al microscopio
<b>Muestra: Huevo entero líquido antes de pasteurizar</b>			
19	<b>Forma:</b> amiboide <b>Borde:</b> crenado <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco	Negativo	Bacilos
20	<b>Forma:</b> puntiforme <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco	Positivo	Cocos
<b>Muestra: Huevo entero líquido pasteurizado</b>			
21	<b>Forma:</b> puntiforme <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco translucido	Positivo	Bacilos
22	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco opaco	Positivo	Cocos



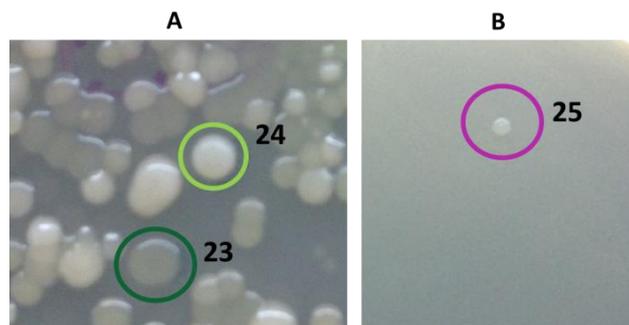
**Figura 9.** Colonias seleccionadas en Agar P. A: Colonias 19 y 20 provenientes de huevo entero líquido antes de pasteurizar. B: Colonias 21 y 22 provenientes de huevo entero líquido pasteurizado.

### Agar F

El agar F (AF) es un medio de cultivo que también se utiliza para la detección de *Pseudomonas spp.* el cual se basa en la producción de fluoresceína. Debe examinarse bajo luz UV (260 nm), y si el resultado es positivo se observa un color amarillo-verdoso fluorescente. Las colonias que crecieron se analizaron bajo las características necesarias pero no se observó alguna con color fluorescente, lo que indicaría que posiblemente no hay presencia de *Pseudomonas*, para corroborarlo se picaron las colonias que crecieron en huevo pasteurizado y no pasteurizado (Tabla 8; Figura 10).

**Tabla 8.** Colonias seleccionadas en agar F con sus características morfológicas y Gram

Número	Morfología colonial	Gram	Morfología al microscopio
<b>Muestra: Huevo entero líquido antes de pasteurizar</b>			
23	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> plano <b>Color:</b> blanco translucido	Positivo	Cocos
24	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco opaco	Positivo	Cocos
<b>Muestra: Huevo entero líquido pasteurizado</b>			
25	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> blanco translucido	Positivo	Cocos



**Figura 10.** Colonias seleccionadas en agar F. A: Colonias 23 y 24 provenientes de huevo entero líquido antes de pasteurizar. B: Colonia 25 proveniente de huevo entero líquido pasteurizado.

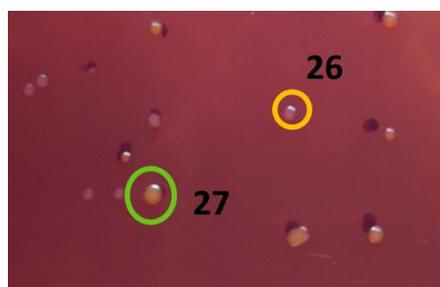
### Agar Palcam

El agar Palcam es un medio selectivo usado para aislar *Listeria spp.* el cual contiene ceftazidima que inhibe el crecimiento de la mayoría de microorganismos diferentes al de interés. El medio es oscurecido si hay hidrólisis de esculina, *Listeria* es positivo para ésta y presenta colonias de color gris-verdoso.

En huevo antes de pasteurizar si hubo presencia de dos tipos de colonias que no son características de *Listeria* y que fueron aisladas (Tabla 9; Figura 11). En la muestra pasteurizada no se obtuvo crecimiento.

**Tabla 9.** Colonias seleccionadas en agar Palcam con sus características morfológicas y Gram

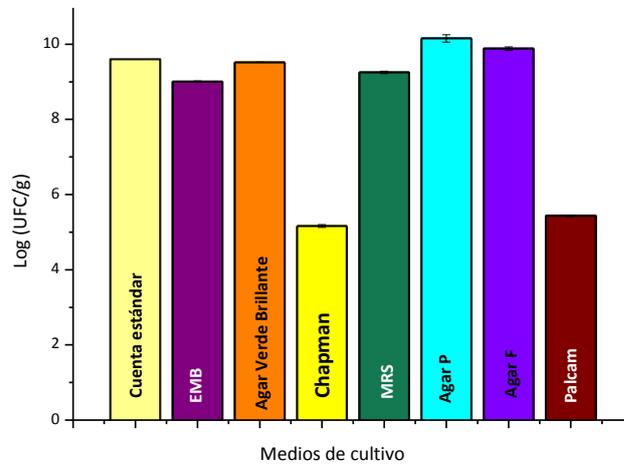
Número	Morfología colonial	Gram	Morfología al microscopio
<b>Muestra: Huevo entero líquido antes de pasteurizar</b>			
26	<b>Forma:</b> puntiforme <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> rosa	Positivo	Cocos
27	<b>Forma:</b> circular <b>Borde:</b> entero <b>Elevación:</b> convexa <b>Color:</b> amarillo	Negativo	Bacilos



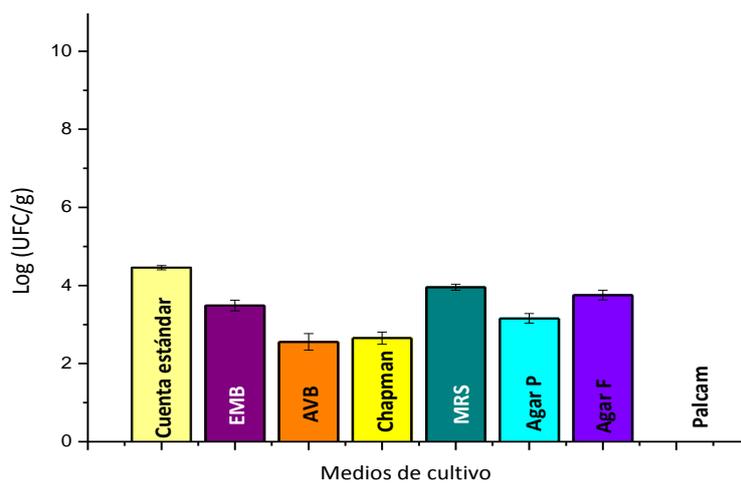
**Figura 11.** Colonias 26 y 27 seleccionadas en agar Palcam provenientes de huevo entero líquido pasteurizado.

De cada uno de los medios de cultivo selectivos se realizó la cuenta total de las unidades formadoras de colonias (UFC) antes y después de pasteurizar el huevo, los resultados se muestran en las Figuras 12 y 13. Se observa alta carga microbiana en el huevo almacenado en el tanque antes de ser pasteurizado y una de las razones es que el producto después de ser quebrado recorre la línea de producción hasta el tanque lo cual lo pone en riesgo de ser contaminado, además de que previamente a su pasteurización se adicionan diferentes ingredientes y/o aditivos, como: proteína de soya para estandarizar el contenido de proteína, estabilizantes, gomas, etc., que al no ser inocuos contaminan al huevo líquido. Una vez pasteurizado (Figura 13) se observa que disminuyó la carga microbiana alrededor de cuatro unidades logarítmicas y en el agar Palcam

no hubo crecimiento. La reducción de los microorganismos se debe al tratamiento térmico (Domínguez, 2012). Algunos microorganismos resisten a este proceso y contribuyen en el deterioro del huevo por lo que para aumentar su vida de anaquel es necesario inhibir a esto.



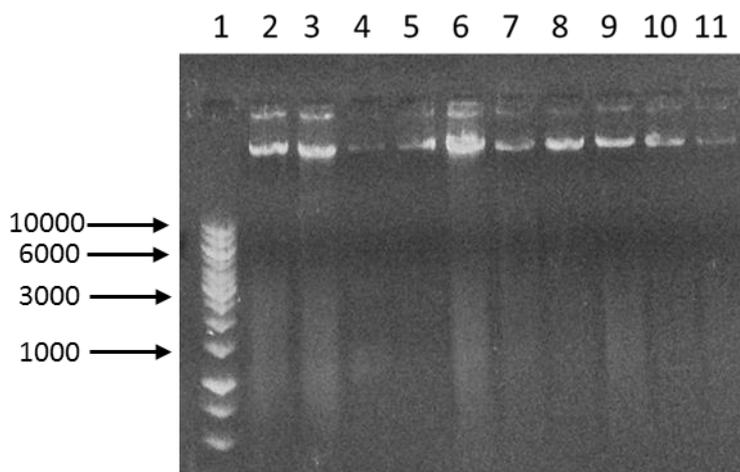
**Figura 12.** Log (UFC/g) en huevo entero líquido antes de pasteurizar.



**Figura 13.** Log (UFC/g) en huevo entero líquido pasteurizado.

## Extracción de ADN

Una vez seleccionadas las colonias de cada medio, se sembraron en medio de cultivo líquido para realizar la extracción de ADN. En la Figura 14 se presenta un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.01%) en el cual se observan bandas definidas y sin barridos, esto se realizó para corroborar la integridad del ADN extraído de todas las cepas aisladas de las muestras de huevo.



**Figura 14.** ADN extraído de colonias aisladas del huevo procesado. Carril 1, marcador 1 kb (Thermo Scientific); carril 2-5, ADN extraído de las cepas 1, 2, 3 y 5, aisladas de huevo líquido antes de pasteurizar, respectivamente; carril 6-10, ADN extraído de las cepas 4, 11, 12, 21 y 22, aisladas de huevo líquido pasteurizado, respectivamente. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.01%

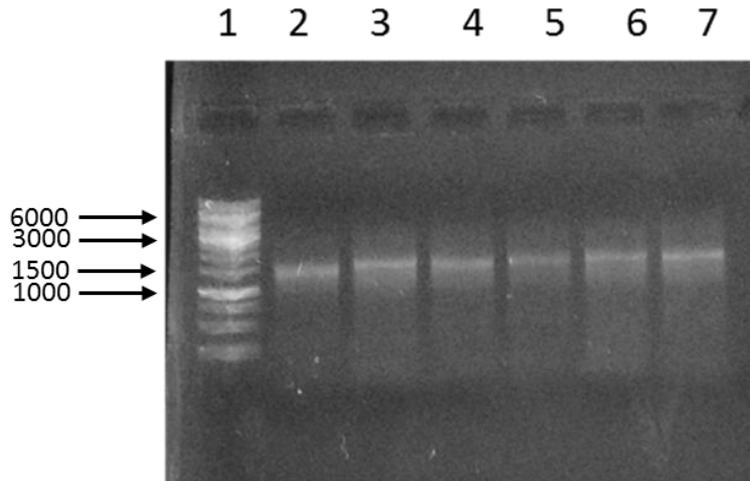
A continuación se presentan los resultados obtenidos de la concentración de ADN (ng/ $\mu$ L) extraído de cada cepa con su relación 260/280 la cual indica la pureza del ADN dependiendo de su composición nucléica, un valor cercano a 1.8 indica que es una muestra pura (Tabla 10).

**Tabla 10.** Concentración de ADN de cada una de las colonias seleccionadas de los medios de cultivo

Número	Medio de cultivo	Concentración de ADN (ng/μL)	Relación A <sub>260/280</sub>
1	EMB	272.43	1.813
2	EMB	263.72	1.768
3	EMB	174.60	1.876
4	EMB	167.81	1.893
5	AVB	291.34	1.827
6	AVB	181.27	1.878
7	AVB	194.34	1.797
8	AVB	197.40	1.872
9	AVB	145.37	1.801
10	AVB	139.70	1.793
11	AVB	215.34	1.906
12	AVB	293.12	2.012
13	Chapman	178.41	1.811
14	Chapman	183.12	1.828
15	Chapman	126.87	1.782
16	MRS	198.14	1.870
17	MRS	201.57	1.816
18	MRS	195.40	1.901
19	AP	225.93	1.794
20	AP	274.24	1.800
22	AP	175.80	1.698
23	AF	139.27	1.757
24	AF	184.23	1.844
25	AF	190.27	1.838
26	Palcam	198.43	1.805
27	Palcam	229.34	1.846

### Amplificación de la región 16S del ADNr por PCR

Una vez corroborada la integridad del ADN extraído se procedió a realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa. En la Figura 15 se muestran los amplicones obtenidos con un peso alrededor de 1,500 pb.



**Figura 15.** Productos de PCR de cepas aisladas de huevo líquido pasteurizado. Carril 1, marcador 1 kb (Thermo Scientific); carril 2-7, amplicones de 1,500 pb de las colonias 4-9 aisladas de huevo pasteurizado. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.01%.

### Identificación

Las bandas de los amplicones se cortaron y se purificaron. El producto se mandó a secuenciar a los laboratorios de Macrogen Inc. en Seúl, Corea. Posteriormente se realizó la comparación de las secuencias con el banco de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleótidos.

En la Tabla 11 se presentan los microorganismos identificados en las muestras de huevo procesado con el porcentaje de similitud.

**Tabla 11.** Identificación de microorganismos aislados de las muestras de huevo

<b>Cepas aisladas de huevo entero líquido antes de pasteurizar</b>			
<b>Número</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Porcentaje de identidad</b>
1	EMB	<i>Kluyvera intermedia</i>	100
2	EMB	<i>Enterococcus faecium</i>	99
3	EMB	<i>Escherichia coli</i>	99
5	AVB	<i>Enterococcus faecium</i>	99
6	AVB	<i>Vibrio metschnikovii</i>	100
7	AVB	<i>Enterococcus faecium</i>	100
8	AVB	<i>Enterococcus faecium</i>	99
9	AVB	<i>Enterococcus faecium</i>	100
10	AVB	<i>Bacillus cereus</i>	100
13	Chapman	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100
14	Chapman	<i>Staphylococcus warneri</i>	100
15	Chapman	<i>Enterococcus faecium</i>	99
16	MRS	<i>Enterococcus faecium</i>	100
17	MRS	<i>Enterococcus faecium</i>	98
18	MRS	<i>Lactococcus garvieae</i>	98
19	AP	<i>Kluyvera intermedia</i>	100
20	AP	<i>Enterococcus faecalis</i>	99
23	AF	<i>Enterococcus faecium</i>	100
24	AF	<i>Enterococcus faecium</i>	100
26	Palcam	<i>Enterococcus faecium</i>	98
27	Palcam	<i>Pseudomonas putida</i>	100
<b>Cepas aisladas de huevo entero líquido pasteurizado</b>			
4	EMB	<i>Enterococcus faecium</i>	99
11	AVB	<i>Enterococcus faecium</i>	99
12	AVB	<i>Enterococcus faecium</i>	99
21	AP	<i>Bacillus pumilus</i>	100
22	AP	<i>Enterococcus faecium</i>	100
25	AF	<i>Enterococcus faecium</i>	100

El género que destaca es *Enterococcus* ya que la mayoría de las cepas identificadas pertenecen a éste, tiene una amplia distribución en el ambiente, frecuentemente se encuentra en los alimentos y puede sobrevivir a los tratamientos a los que son sometidos. En octubre de 2016 en un análisis de 390 muestras de productos cárnicos se reportó que el 74.1% presentaron cepas de *Enterococcus* de las cuales 48.7% pertenecían a *Enterococcus faecalis* y el 39.7% a *Enterococcus faecium* (Chajęcka-Wierzchowska, 2016).

Se identificó el género *Staphylococcus*, normalmente algunas especies se encuentran en la piel sin causar daño. *Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista, por lo que la NOM-159-SSA1-1996 establece límites < 100 UFC/g en huevo líquido refrigerado. Este microorganismo no se detectó, sin embargo en el huevo antes de pasteurizar se aislaron dos cepas del agar Chapman, medio selectivo para estafilococos, las cuales fueron *S. saprophyticus* y *S. warneri*. El primero se ha asociado en infecciones en el tracto urinario en mujeres (Hirzel, 2004) y *S. warneri* está relacionado a enfermedades nosocomiales (Campoccia *et al.*, 2010). Por otra parte, *Kluyvera intermedia* y *Escherichia coli* son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, los dos fueron aislados de muestras de huevo líquido antes de pasteurizar en el agar EMB y *Kluyvera intermedia* también se encontró en agar P, ésta no tiene reportes de ser causante de enfermedades humanas. *E. coli*, ha sido reportado en cáscaras de huevo contaminadas con heces fecales o por el medio ambiente (Grande, 2016), es un microorganismos que ha causado brotes infecciosos. En un estudio de cáscara de huevo fresco se encontró que de las enterobacterias aisladas a partir de las muestras, *E. coli* predominaba (Leyva *et al.*, 1996). *Vibrio metschnikovii* fue encontrado en el agar verde brillante en huevo líquido antes de pasteurizar, éste ha sido aislado de animales de granja como pollos, vacas y cerdos (Hans-Jörg, *et al.*, 2004) generalmente no está relacionado con enfermedades aunque si hay reportes de ser agente causal en pacientes inmunocomprometidos.

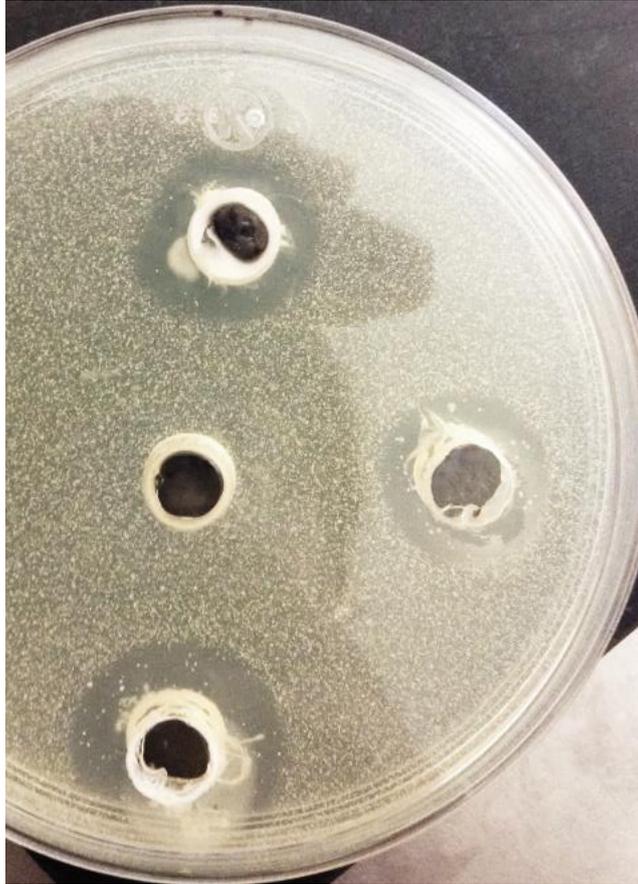
*Pseudomonas putida* es considerado un patógeno de baja virulencia, que puede causar infecciones nosocomiales (Treviño *et al.*, 2010) y se ha encontrado principalmente en leche. *P. putida* tuvo crecimiento en muestra de huevo líquido antes de pasteurizar aislado del agar Palcam el cual tiene ceftazidima que es una cefalosporina de tercera generación, otras especies de *Pseudomonas* han presentado resistencia a este antibiótico (Gómez *et al.*, 2005; Nicolau y Oliver, 2010; Mlynarcik y Kolar 2016). El género *Pseudomonas* destaca por la resistencia intrínseca a distintos antibióticos, además de tener la capacidad de desarrollar nuevas resistencias por mutaciones cromosómicas (Nicolau y Oliver, 2010). En muestras de huevo líquido pasteurizado no hubo ningún crecimiento en agar Palcam, por lo que puede que este microorganismo no sobrevive al tratamiento térmico.

En agar MRS fue identificado *Lactococcus garvieae*, el cual es un patógeno asociado a enfermedades gastrointestinales, se reportó en pacientes que consumieron pescado crudo (Wang *et al.*, 2007).

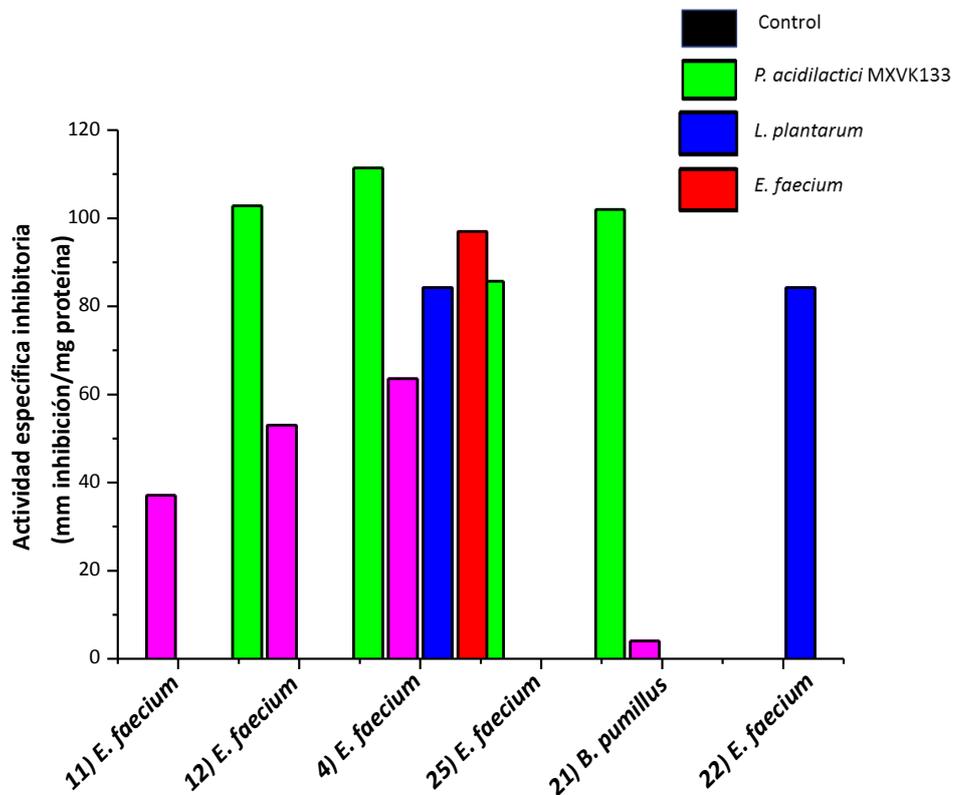
Del género *Bacillus* estuvieron presentes *Bacillus cereus* en huevo líquido antes de pasteurizar y *Bacillus pumilus* en huevo líquido pasteurizado. *B. cereus* es un patógeno que produce dos tipos de enterotoxinas por lo que es de interés en cuestiones de salud pública. *B. pumilus* es un Gram-positivo que forma endosporas resistentes a condiciones desfavorables y variables (Benardini *et al.*, 2003) por esta característica principalmente es probable que se haya encontrado en muestra ya pasteurizada, este microorganismo no está asociado como causante de enfermedades y en marzo del año 2015 fue certificado por la FDA como GRAS (Olmos y Paniagua, 2014).

#### **Evaluación de actividad antimicrobiana de las BAL por difusión en agar contra cepas aisladas de huevo líquido pasteurizado**

Una vez identificados los diferentes microorganismos en el huevo se realizaron pruebas de actividad inhibitoria por medio de difusión en agar considerándose positivo si hay presencia de halos (Figura 16), sobre la microbiota presente en las muestras de huevo pasteurizado, ya que es necesario inhibir a estos microorganismos que resisten el tratamiento térmico. Para estas pruebas se emplearon los extractos crudos de las siguientes cepas: *Pediococcus acidilactici* MXVK133, *Enterococcus faecium* MXVK29, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*. Se midieron los halos de inhibición y se correlacionó con la cantidad de proteína para obtener las unidades de actividad específica inhibitoria, los resultados se presentan en la Figura 17.



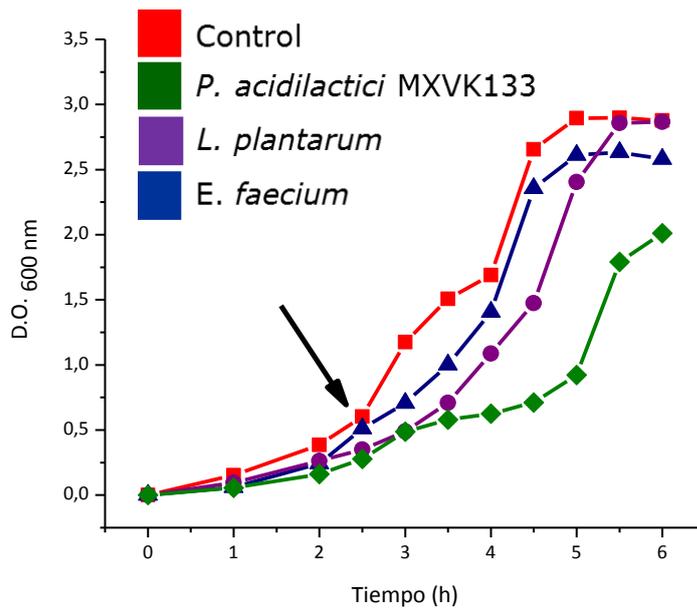
**Figura 16.** Difusión en agar utilizando el sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 contra cepas aisladas de huevo pasteurizado



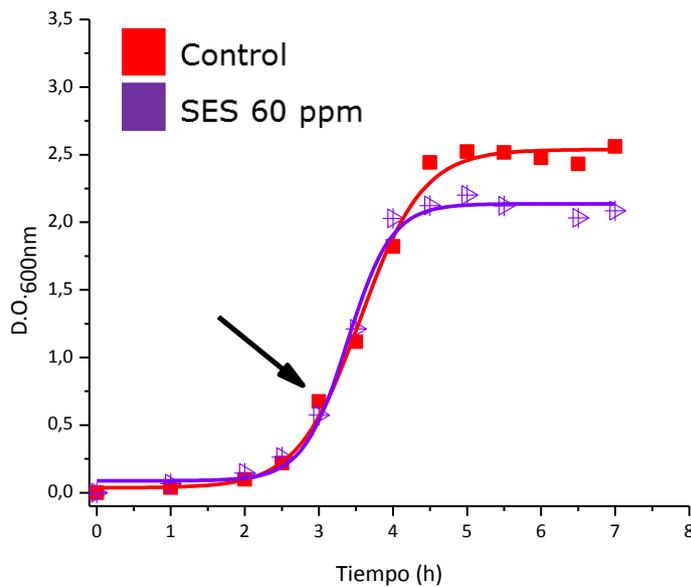
**Figura 17.** Actividad específica inhibitoria expresada en mm de inhibición/mg proteína producidos por el extracto crudo de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas y utilizando como microorganismos blanco a las seis cepas aisladas de huevo pasteurizado.

### Efecto de los compuestos antimicrobianos sobre el crecimiento de la microbiota total de huevo entero líquido pasteurizado

Se obtuvo la curva de crecimiento de la microbiota total presente en huevo pasteurizado y se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos crudos producidos por las BAL y de la solución electrolizada de superoxidación (SES) los cuales se agregaron a las 2.5 y 3 h de inoculación, respectivamente y se monitoreó la D.O.<sub>(600 nm)</sub> por 3.5 h. Se observó que la D.O.<sub>600 nm</sub> comienza a disminuir después de 0.5 h de añadir el sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 (Figura 18) y al término del monitoreo, este sobrenadante reduce, respecto al control, una unidad la D.O.<sub>600 nm</sub>. Por otra parte, al emplear la SES en 60 ppm se observa disminución de la D.O.<sub>600 nm</sub> a la hora de su adición, disminuyendo finalmente 0.5 unidades. (Figura 19).



**Figura 18.** Curva de crecimiento (D.O. 600 nm/h) de la microbiota total de huevo líquido pasteurizado. Control (■), sobrenadantes de: *P. acidilactici* MXVK133 (◆), *L. plantarum* (●), *E. faecium* (▲).



**Figura 19.** Curva de crecimiento (D.O. 600 nm/h) de la microbiota total de huevo líquido pasteurizado. Control (■), SES 60 ppm (▼).

## Determinación de la actividad antimicrobiana de la SES según la NMX-BB-040-SCFI-1999

Se determinó el porcentaje de reducción de la SES sobre la microbiota total del huevo líquido pasteurizado. Se probaron dos concentraciones de SES, 60 ppm y 30 ppm y a partir de las UFC/mL se calculó el porcentaje de reducción (Tabla 12).

**Tabla 12.** Porcentaje de reducción de la microbiota total de huevo líquido pasteurizado, utilizando SES 60 ppm y 30 ppm

	UFC/mL	Porcentaje de reducción
<b>Cuenta viable inicial</b>	1.9x10 <sup>6</sup>	
<b>Células sobrevivientes SES (60 ppm)</b>	7.3x10 <sup>4</sup>	96.2
<b>Células sobrevivientes SES (30 ppm)</b>	3.2x10 <sup>2</sup>	99.9

## Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado

Se estimó una vida de anaquel en muestras de huevo entero líquido pasteurizado utilizando compuestos antimicrobianos con diferentes condiciones, las cuales se muestran a continuación (Tabla 13):

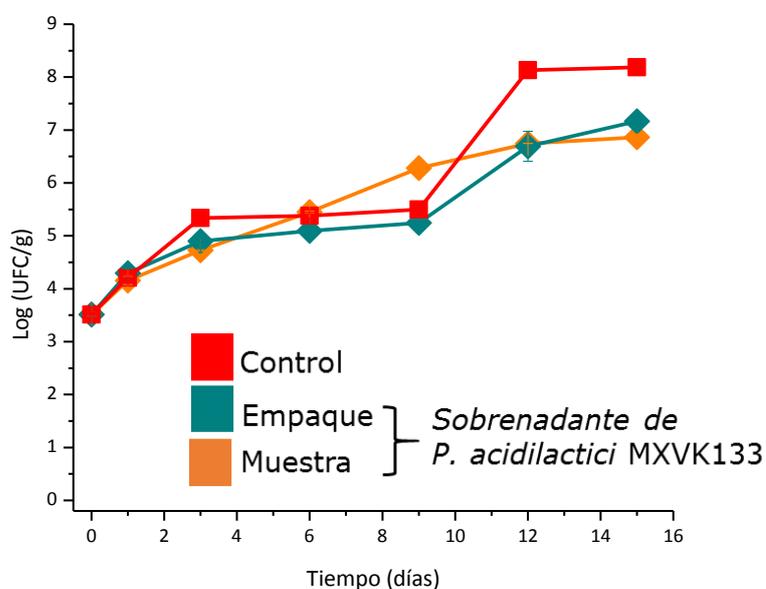
**Tabla 13.** Compuestos antimicrobianos utilizados en la vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado

<b>Sobrenadante <i>P. acidilactici</i> MXVK133</b>	<b>SES</b>	<b>Empaque al vacío</b>
Agregado por aspersión en la bolsa de empaque.	60 ppm agregado por aspersión en la bolsa de empaque.	SES (30 ppm) agregado por aspersión en la bolsa de empaque y envasado al vacío.
Agregado por aspersión directo en la muestra.	30 ppm agregado por aspersión en la bolsa de empaque.	Empaque al vacío.
	10 ppm agregado directo en la muestra.	

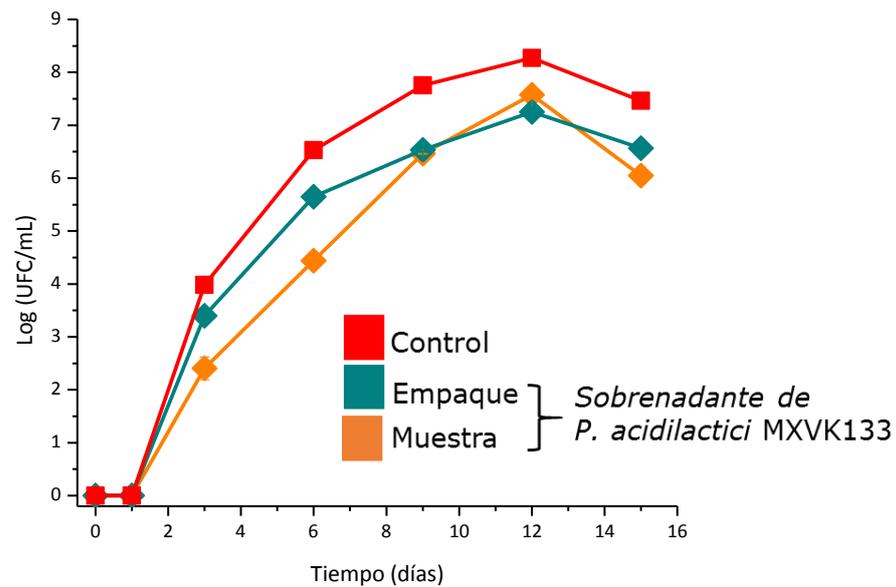
### Sobrenadante de *Pediococcus acidilactici* MXVK133

El sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 se agregó por aspersión directamente en el huevo. A los 15 días de la vida de anaquel se presentaron, para el caso de mesófilos  $7.34 \times 10^6$  UFC/g, dos ciclos logarítmicos menores al control. Para enterobacterias hubo una disminución de una unidad logarítmica (Figura 20 y 21).

El sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 también se añadió por aspersión solamente en la bolsa de empaque, con esto al día 15 de la vida de anaquel se logra disminuir un ciclo logarítmico el crecimiento de mesófilos y enterobacterias.



**Figura 20.** Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado utilizando el sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 directo en la muestra (◆) y en la bolsa de empaque (◆) comparando con el control (■). Log (UFC/g muestra) de mesófilos en función del tiempo.



**Figura 21.** Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado utilizando el sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 directo en la muestra (◆) y en la bolsa de empaque (◆) comparando con el control (■). Log (UFC/g muestra) de enterobacterias en función del tiempo.

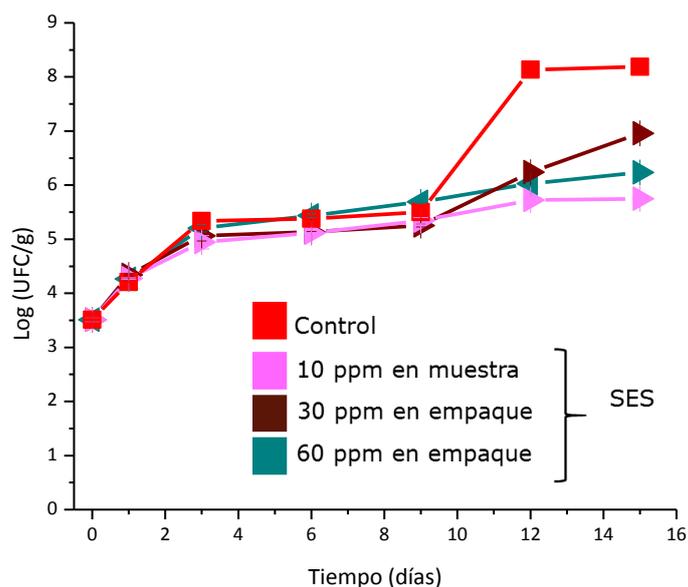
Las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) de mesófilos y enterobacterias, utilizando el sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 se muestran en la Tabla 14. El control presentó un valor superior, lo que significa que la cantidad de células que crecen por gramo de muestra por tiempo es mayor que al utilizar el sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133, tanto en empaque como directamente en la muestra. El valor aproximado en la reducción, en unidad de tiempo fue de 1 día, lo cual nos indica que la microbiota del huevo es afectada durante el crecimiento al añadir compuestos con actividad antimicrobiana provenientes de BAL, contribuyendo a alargar la vida de anaquel del huevo pasteurizado.

**Tabla 14.** Velocidades específicas de crecimiento

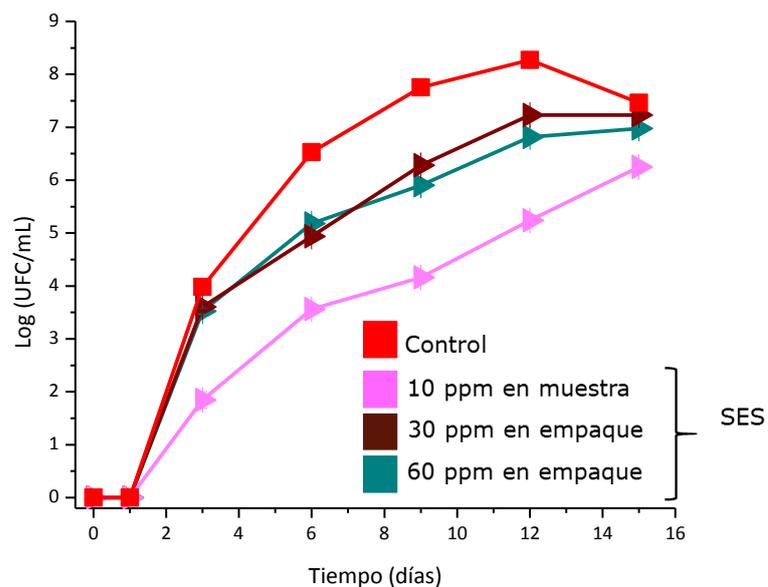
Tratamiento	Mesófilos $\mu$ (días <sup>-1</sup> )	Enterobacterias $\mu$ (días <sup>-1</sup> )
Control	0.299 ± 0.0465	0.561 ± 0.131
Sobrenadante <i>P. acidilactici</i> MXVK133 en empaque	0.217 ± 0.0269	0.492 ± 0.109
Sobrenadante <i>P. acidilactici</i> MXVK133 en muestra	0.225 ± 0.0233	0.499 ± 0.0983

### **Solución electrolizada de superoxidación (SES)**

La SES disminuyó la carga microbiana en la muestra, el tratamiento que tuvo mayor efecto fue la aspersion de SES directamente en la muestra y en una concentración de 10 ppm, añadida en una cantidad del 1% respecto al volumen de huevo pasteurizado. Se reducen 3 unidades logarítmicas en mesófilos y una unidad en enterobacterias (Figura 22 y 23).



**Figura 22.** Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado utilizando SES directo en la muestra a 10 ppm (▲), SES 30 ppm (▶) y 60 ppm (►) en la bolsa de empaque comparando con el control (■). Log (UFC/g muestra) de mesófilos en función del tiempo.



**Figura 23.** Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado utilizando SES directo en la muestra a 10 ppm (▲), SES 30 ppm (▶) y 60 ppm (►) en la bolsa de empaque comparando con el control (■). Log (UFC/g muestra) de enterobacterias en función del tiempo.

Las velocidades específicas de crecimiento de mesófilos y enterobacterias, utilizando la SES en diferentes concentraciones se observan en la Tabla 15. El control presentó un valor superior en la  $\mu$  y al utilizar la SES se obtienen valores menores de velocidad de crecimiento, o sea que hay menor número de células presentes en la muestra por unidad de tiempo. Esto significa que la SES está inhibiendo a los microorganismos presentes en el huevo líquido pasteurizado.

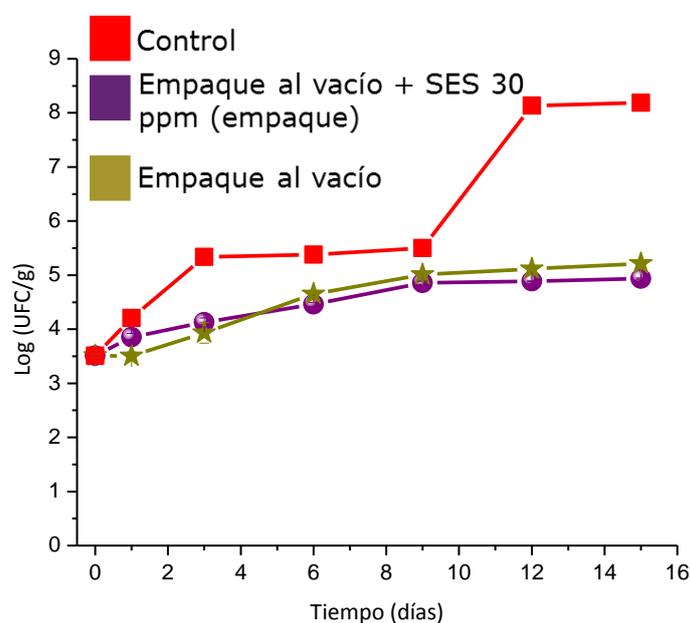
**Tabla 15.** Velocidades específicas de crecimiento

Tratamiento	Mesófilos $\mu$ (días <sup>-1</sup> )	Enterobacterias $\mu$ (días <sup>-1</sup> )
Control	0.299 ± 0.0465	0.561 ± 0.131
SES 60 ppm en empaque	0.158 ± 0.0315	0.488 ± 0.0898
SES 30 ppm en muestra	0.191 ± 0.0272	0.515 ± 0.088
SES 10 ppm en muestra	0.129 ± 0.0271	0.426 ± 0.0374

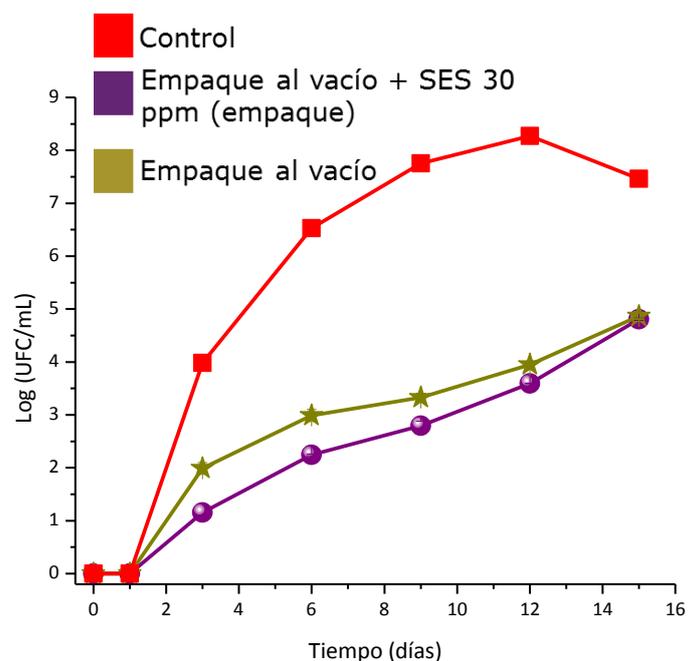
### ***Empaque al vacío de huevo líquido pasteurizado***

Se utilizó el empaque al vacío como otra alternativa para alargar la vida de anaquel del producto. Se evaluaron dos condiciones, en la primera se agregó por aspersion SES en una concentración de 30 ppm en la bolsa de empaque, luego se introdujo la muestra y se empacó al vacío. En la segunda condición, solamente se empacó la muestra al vacío. Con la reducción en la concentración de oxígeno que está en contacto con la muestra ayuda a extender la vida de anaquel, ya que se inhibe el desarrollo de microorganismos aerobios. Este tipo de empaque es comúnmente usado para diversos alimentos como productos cárnicos curados y quesos (Gobantes *et al.*, 2001).

La disminución de las UFC es evidente al utilizar vacío, ya que al día 15 hay una reducción de 3 unidades logarítmicas, en ambas condiciones, con respecto al control (Figura 24 y 25).



**Figura 24.** Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado utilizando SES 30 ppm en la bolsa de empaque y posterior envasado al vacío (•), empaque al vacío (★), comparando con el control (■). Log (UFC/g muestra) de mesófilos en función del tiempo.



**Figura 25.** Vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado utilizando SES 30 ppm en la bolsa de empaque y posterior envasado al vacío (●), empaque al vacío (★), comparando con el control (■). Log (UFC/g muestra) de enterobacterias en función del tiempo.

Las  $\mu$  de mesófilos y enterobacterias, utilizando el empaque al vacío y la SES, se observan en la Tabla 16. Los dos tratamientos empleados disminuyeron considerablemente la velocidad de crecimiento respecto al control.

**Tabla 16.** Velocidades específicas de crecimiento

Tratamiento	Mesófilos $\mu(\text{días}^{-1})$	Enterobacterias $\mu(\text{días}^{-1})$
Control	$0.299 \pm 0.0465$	$0.561 \pm 0.131$
Vacío+SES 30 ppm en empaque	$0.0934 \pm 0.0146$	$0.317 \pm 0.0179$
Vacío	$0.127 \pm 0.0175$	$0.319 \pm 0.0418$

Finalmente se presenta la vida de anaquel estimada a una temperatura de almacenamiento de 4 °C de cada una de las condiciones evaluadas. Sin ningún tratamiento, el huevo líquido tiene una vida de anaquel de 10 días. El tiempo de vida útil del producto aumentó a 27 días al ser empacado al vacío, ya que al disminuir la cantidad de oxígeno se inhibe el crecimiento de microorganismos aerobios, además de las reacciones de oxidación. Cuando este método es usado en conjunto con la aplicación por aspersion de SES 30 ppm se logró alcanzar los 34 días de vida útil, por lo que este tratamiento sería el óptimo para conservar el producto por un período mayor. Sin embargo, al emplear el sobrenadante de *P. acidilactici* en la muestra, los días de vida de anaquel se extienden solamente de 10 a 13 (Tabla 17).

**Tabla 17.** Vida de anaquel de huevo entero líquido pasteurizado en días a 4 °C de cada tratamiento

Tratamiento	m	b	R <sup>2</sup>	Vida de anaquel estimada a 4 °C (días)
<b>Control</b>	0.2986	3.7885	0.8922	10
<b>Sobrenadante <i>P. acidilactici</i> (en muestra)</b>	0.224	3.9312	0.9467	13
<b>Sobrenadante <i>P. acidilactici</i> (en empaque)</b>	0.2169	3.8449	0.9286	14
<b>SES 60 ppm (en empaque)</b>	0.1577	4.1599	0.8330	18
<b>SES 30 ppm (en empaque)</b>	0.1927	3.9547	0.9073	15
<b>SES 10 ppm (en muestra)</b>	0.1291	4.1017	0.8195	22
<b>Vacío + SES 30 pp (en empaque)</b>	0.0933	3.763	0.8911	34
<b>Vacío</b>	0.1258	3.6006	0.9145	27

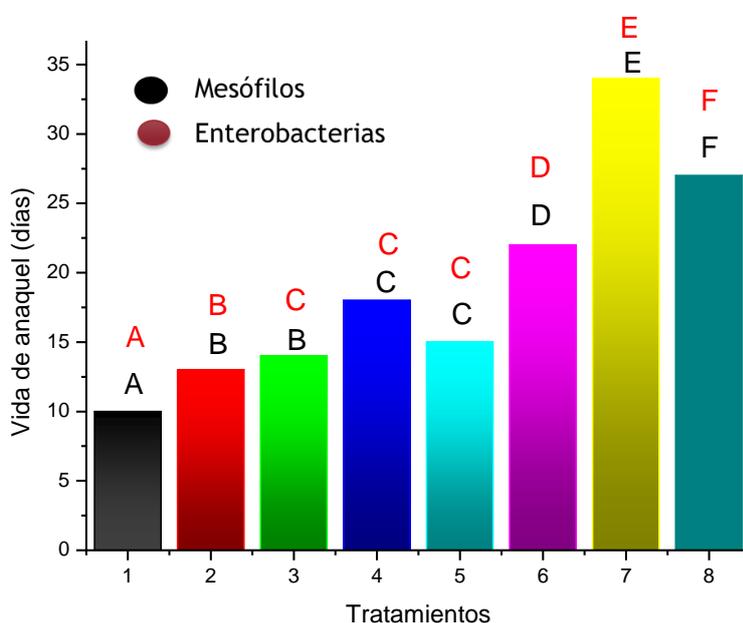
Los resultados obtenidos del estudio de vida de anaquel para los diferentes tratamientos con compuestos antimicrobianos y empaque al vacío se sometieron a un análisis de varianza (Tabla 18), comparación de medias por Duncan (Figura 26) así como un análisis de componentes principales (Figura 27). Para ambas poblaciones microbianas se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, el tiempo y la interacción tratamiento\*día ( $P < 0.0001$ ),

En la Figura 27 se muestra el análisis de componentes principales (PCA), el cual es una técnica estadística que permite integrar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos por medio de la representación de las medidas numéricas en un plano dividido en cuadrantes. El análisis agrupa todas las variables de respuesta en dos factores (F1 y F2), de acuerdo con el coeficiente de correlación, la suma del porcentaje de los dos factores indica la variación total explicada, es decir la eficiencia del análisis. Para el huevo procesado los factores F1 y F2 representan el 98.55% y 1.45%, respectivamente, es decir que el PCA explica el 100% de la variabilidad total entre tratamientos y que la diferencia entre tratamientos se explica principalmente por su ubicación en el eje del F1.

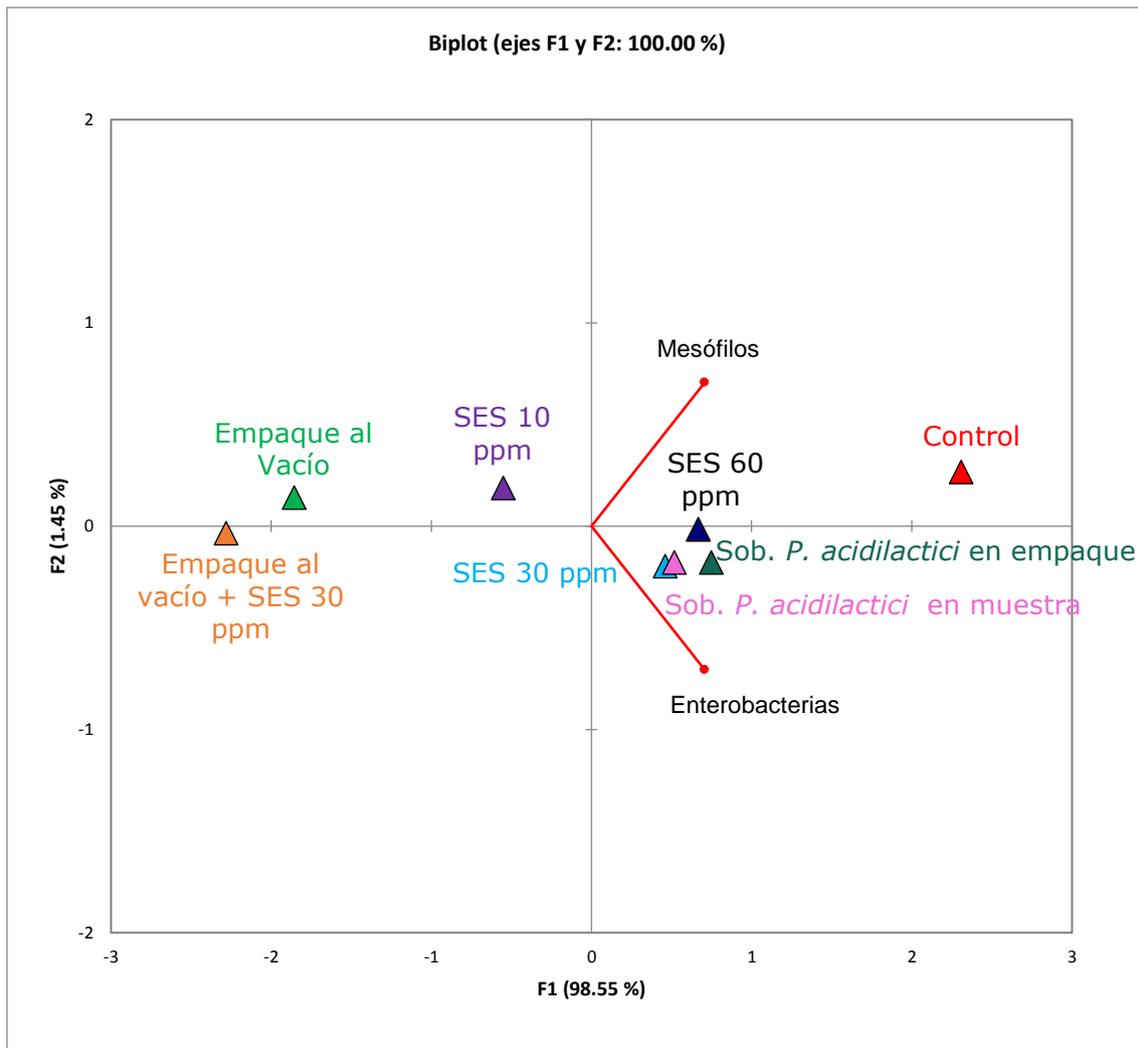
En el plano dividido en cuadrantes se ubican todos los tratamientos, representados por triángulos de color azul, mientras que los cuadrantes rojos representan la magnitud de cada una de las variables de respuesta. Los tratamientos ubicados en cuadrantes distintos son significativamente diferentes y, caracterizados por una mayor media de las variables de respuesta que tienen la misma ubicación. Al comparar todas las variables de respuesta se encontró que el control ubicado en el extremo derecho del plano presentó la mayor población de enterobacterias y mesófilos, seguido de los tratamientos con SES 60 ppm, SES 30 ppm, con sobrenadante de *P. acidilactici* directo en muestra y sobrenadante de *P. acidilactici* en empaque, además no se encontró diferencia significativa entre estos últimos. Por otra parte los tratamientos con SES 30 ppm en bolsa de empaque, empaque al vacío con SES 30 ppm y solamente empacado al vacío, ubicados en el extremo izquierdo del plano, presentaron la menor población microbiana; no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con empaque al vacío y con SES 10 ppm (cuadrante superior del plano). Acorde con el PCA y la comparación de medias se puede señalar que el tratamiento de empaque al vacío con SES 30 ppm es el más eficiente.

**Tabla 18.** Resumen del análisis de varianza para huevo procesado sometido a distintos tratamientos

	Mesófilos log(UFC/g)	Enterobacterias log(UFC/g)
<b>R<sup>2</sup></b>	0.998	0.997
<b>F</b>	555.015	382.289
<b>Pr &gt; F</b>	< 0.0001	< 0.0001
<b>Tratamiento</b>	1062.042	326.591
	< 0.0001	< 0.0001
<b>Día</b>	2611.222	2869.852
	< 0.0001	< 0.0001
<b>Tratamiento*Día</b>	159.866	38.063
	< 0.0001	< 0.0001

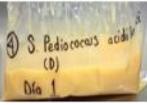
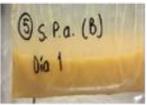
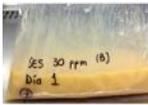
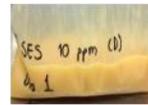
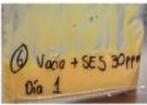
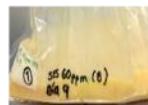
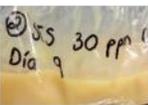
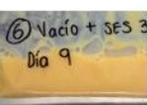
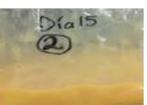
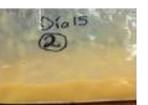
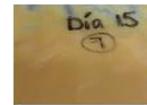


**Figura 26.** Resumen de la comparación de medias por Duncan para mesófilos y enterobacterias en huevo líquido pasteurizado. Tratamientos: **1.** Control, **2.** SES 60 ppm (en empaque), **3.** Sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 (en empaque), **4.** Sobrenadante de *P. acidilactici* MXVK133 (en muestra), **5.** SES 30 ppm (en empaque), **6.** SES 10 ppm (en muestra), **7.** Empaque al vacío + SES 30 ppm (en empaque), **8.** Empaque al vacío.



**Figura 27.** Análisis de componentes principales entre tratamientos empleados en la estimación de vida de anaquel de huevo líquido pasteurizado. (▲): SES 60 ppm en empaque, (▲): SES 30 ppm en empaque, (▲): SES 10 ppm, (▲): Sobrenadante de *P. acidilactici* añadido en muestra, (▲): Sobrenadante de *P. acidilactici* añadido en empaque, (▲): Empaque al vacío + SES 30 ppm, (▲): Empaque al vacío y (▲): Control.

En la Figura 28 se presentan imágenes de la muestra con cada tratamiento evaluado en los días 1, 9 y 12 de la vida de anaquel, se puede observar que el control al día 15 presenta un cambio en el color, al igual que el tratamiento con SES 60 ppm aplicado en la bolsa. Las muestras empacadas al vacío no presentaron cambio de color. En ningún caso se observó cambio de textura o separación de fases.

	<i>P. acidilactici</i> directo en muestra	<i>P. acidilactici</i> en bolsa	SES 60 ppm en bolsa	SES 30 ppm en bolsa	SES 10 ppm 1%	Empacado al vacío	Vacío + SES 30 ppm en bolsa	Control
DÍA 1								
DÍA 9								
DÍA 15								

**Figura 28.** Muestras de huevo entero líquido pasteurizado durante los días 1, 9 y 15 de la vida de anaquel bajo las condiciones estudiadas.

## CONCLUSIONES

A partir de muestras de huevo procesado se lograron aislar e identificar 27 bacterias utilizando medios de cultivo tradicionales de microbiología y técnicas de biología molecular. De los microorganismos identificados sobresale el género *Enterococcus* ya que se encuentra presente tanto en huevo líquido antes de pasteurizar como en el ya tratado térmicamente.

Se obtuvo el extracto crudo con actividad inhibitoria a partir de las bacterias ácido lácticas: *P. acidilactici* MXVK133, *E. faecium* MXVK29, *L. plantarum* y *E. faecium*. Se evaluó la actividad antimicrobiana contra microorganismos aislados de huevo líquido pasteurizado. *P. acidilactici* MXVK133 presentó la mayor inhibición en la difusión en agar, destacando su actividad contra *B. pumilus* aislado de las muestras.

Se estimó una vida de anaquel del huevo líquido pasteurizado empleando diferentes tratamientos, de los cuales el que tiene un mejor resultado es la aspersión de SES 30 ppm en la bolsa del empaque y envasado al vacío, esto alarga la vida útil del producto de 10 a 34 días.

## PERSPECTIVAS

Purificar la proteína de *P. acidilactici* para evaluar su efecto en la vida útil de huevo líquido pasteurizado.

Utilizar el sobrenadante de *P. acidilactici* en conjunto con el de *E. faecium* MXVK29 agregados por aspersión en muestras de huevo y evaluar la vida de anaquel.

Evaluar cuantitativamente el color de la muestra a lo largo de la vida de anaquel utilizando los distintos tratamientos.

Evaluar funcionalidad del huevo entero líquido pasteurizado con los distintos tratamientos.

## REFERENCIAS

- Al-Ajeeli, M.N., Taylor, T.M., Alvarado, C.Z., Coufa, I. C.D. (2016). Comparison of eggshell surface sanitization technologies and impacts on consumer acceptability. *Poultry Science*. 95 (5), 1191-7.
- Applegate, E. (2000). Introduction: Nutritional and functional roles of eggs in the diet. *Journal of the American College of Nutrition*. 19 (5), 495–498.
- Benardini, J.N., Sawyer, J., Venkateswaran, K., Nicholson, W.L. (2003). Spore UV and acceleration resistance of endolithic *Bacillus pumilus* and *B. subtilis* isolates obtained from Sonoran desert basalt: implications for lithopanspermia. *Astrobiology*. 3, 709-717.
- Bottger, E.C. (1989). Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiology Letters*. 65, 171-176.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García C., Sáez-Nieto, A. (2011). Bacterial Identification methods in the microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29 (8), 601-608.
- Campoccia, D., Montanaro, L., Visai, L., Arciola, C.R. (2010). Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. *The International Journal of Artificial Organs*. 33, 575-581.
- Cao, W., Zhu, Z.W., Shi, Z.X., Wang, C., Li, B.M. (2009). Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella enteritidis* and its contaminated shell eggs. *International Journal of Food Microbiology*. 130, 88–93.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28, 281-370.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2001). *Salmonella enteritidis* disease information fact sheet. Consultado en línea el 29 de noviembre del 2016. Disponible en [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salment\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salment_g.htm)

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2004). *Salmonella* serotype *typhimurium* outbreak associated with commercially processed egg salad. Consultado en línea el 26 de noviembre del 2016. Disponible en <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5348a3.htm>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). Multistate outbreak of *Salmonella* Oranienburg infections linked to good earth egg company shell eggs (Final Update). Consultado en línea el 26 de noviembre del 2016. Disponible en <https://www.cdc.gov/salmonella/oranienburg-10-16/index.html>.
- Cepeda, A., Franco, C.M, Lamas, A., Miranda, J.M., Redondo-Valbuena C., Roca-Saavedra P., Rodríguez J.A. (2015). Egg and egg-derived foods: Effects on human health and use as functional foods. *Nutrients* 7, 706-729.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Łaniewska-Trokenheim, L. (2016). Diversity of antibiotic resistance genes in *Enterococcus* strains isolated from ready-to-eat meat products. *Food Microbiology and Safety*. DOI: 10.1111/1750-3841.13523, 2779-2807.
- Chousalkar, K.K., Flynn, P., Sutherland, M., Roberts, J.R., Cheetham, B.F. (2010). Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial eggshells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *International Journal of Food Microbiol.* 42(1-2), 207-213.
- Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Journal of Clinical Microbiology*.17 (4), 840-862.
- Downes, F.P., Ito K., (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4<sup>a</sup> ed. *American Public Health Association*, 473.
- Domínguez, F.A. (2012). Aspectos microbiológicos del huevo y sus derivados. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Elafify, M., Elsherbini, M., Abdelkhalek, A., Al-Ashmawy, M. (2015) Prevalence and molecular characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from

table eggs in Mansoura, Egypt. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. ISSN 2311-7710.

Fabrizio, K.A., Sharma, R.R., Demirci, A., Cutter, C.N. (2002). Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. *Poultry Science Journal*. 81, 1598–1605.

Food and Drug Administration (FDA) (2011). El huevo en cifras. Consultado en línea el 15 de octubre del 2016. Disponible en <http://www.fao.org/assets/infographics/FAO-Infographic-egg-facts-es.pdf>.

Food and Drug Administration (FDA) (2016). Good earth Egg Company voluntarily recalls shell eggs because of a possible health risk. Consultado en línea el 26 de noviembre del 2016. Disponible en <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm523727.htm>

Galiş, A.M., Marcq, C., Marlier, D., Portetelle, D., Van, I., Beckers, Y., Théwis, A. (2013). Control of *Salmonella* contamination of shell eggs—preharvest and postharvest methods. *Reviews in Food Science and Food Safety*. 12, 155–182.

Gal-Mor, O., Boyle, E.C., Grassl, G.A. (2014). Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*. 5, 391.

Gantois, I., Eeckhaut, V., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van, I. (2008). A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathology*. 37, 399–406.

García-Cano, I. (2013). Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: Detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química UNAM.

García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M.C. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT—Food Science and Technology*. 59, 26-34.

- Gobantes, I., Gómez, R., Choubert, G. (2001). Envasado de alimentos. Aspectos técnicos del envasado al vacío y bajo atmósfera protectora. *Alimentación, equipos y tecnología*. 1, 75-79.
- Gómez, B.E. (2010). Identificación de bacterias halófilas presentes en queso Cotija por métodos independientes de cultivo. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Gómez, C.A., Leal A.L., Pérez, M.J., Navarrete, M.L. (2005). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista de la Facultad de Medicina*. 53.
- Grande, M.J., Fernández, M.L., Pérez, R., Gálvez, A., Lucas, R. (2016). Virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from hen egg shells. *International Journal of Food Microbiology*. 238, 89-95
- Hans-Jörg, L., Reinhard S., Jayasinghe U.R., Norbert L., Stefan K. and Lothar B. (2004). *Vibrio metschnikovii*, a Rare Cause of Wound Infection. *Journal of Clinical of Microbiolgy*. 10, 4909-4911.
- Handelsman, J., M. Liles, D. Mann, C. Riesenfeld, R. M. (2002). Cloning the metagenome: Culture-Independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. *Methods in Microbiology*. 33, 241-255.
- Health Protection Agency, London, United Kingdom (2012). *Salmonella enteritidis* PT1 associated with consumption of liquid egg product. Health protection report 6. Consultado en línea el 26 de noviembre del 2016. Disponible en: <http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2012/hpr4212.pdf>
- Hirzel, W. (2004). Implicancias de *Staphylococcus saprophyticus* en la patología infecciosa urinaria de la mujer. *Acta Bioquímica Latinoamericana*. 38 (2).
- Hope, B.K., Baker, R., Edel, E.D., Houe, A.T., Schlosser, W.D., Ehiting, R.M., McDowell, R., Morales, R.A. (2002). An overview of the *Salmonella enteritidis* risk assessment for shell eggs and egg products. *Risk Analysis*. 22, 203-218.

- Howard, Z.R., O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C. (2012). *Salmonella enteritidis* in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Research International*. 45, 755–764.
- Ismail, J., Mansour, H., Hosny, A. (2014). Prevalence and inhibition of microbial load on chicken eggs with special references to egg quality and hatchability. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 9 (4), 294-302.
- Keerthirathne, T.P., Ross, K., Fallowfield, H., Whiley, H. (2016). A review of temperature, pH, and other factors that influence the survival of *Salmonella* in mayonnaise and other raw egg products. *Pathogens*. 5(4), DOI: 10.3390/pathogens5040063.
- Keller, L.H., Schifferli, D.M., Benson, C.E., Aslam, S., Eckroade, R.J. (1997). Invasion of chicken reproductive tissues and forming eggs is not unique to *Salmonella enteritidis*. *Avian Diseases*. 41, 535-539.
- Kornacki, J., Johnson, J. (2001). *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. *American Public Health Association*. 69-80.
- Leyva, C., Valdés, A., Cisneros, D., Pérez, R. (1996). Determinación de *Salmonella* y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 10 (2).
- Lopez, A. (2015). Expresión del gen estructural e inductor de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* y su efecto en la variación de la actividad antimicrobiana. Tesis de Maestría en Biotecnología, UAM-Iztapalapa.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M. (2010). International Collaboration on Enteric Disease Burden of Illness Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*. 50, 882–889.
- Mlynarcik, P., Kolar, M. (2016). Starvation and antibiotics induced formation of persister cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky*. DOI: 10.5507.

- Mossel, D., Moreno, B., Struijk, C. (2003). Microbiología de los alimentos, 2da ed. Acribia, Zaragoza. 123-124.
- Naviglio, D., Gallo, M., Le Grottaglie, L., Scala, C., Ferrara, L., Santini, A. (2012). Determination of cholesterol in Italian chicken eggs. *Food Chemistry*. 132, 701-708
- Newman, K.L., Leon, J.S., Rebolledo, P.A., Scallan, E. (2015). The impact of socioeconomic status on foodborne illness in high-income countries: A systematic review. *Epidemiology and Infection*. 143, 2473–2485.
- Nicolau, C.J., Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28 (1), 19-28.
- NMX-F-330-S-1979. Huevo entero deshidratado o en polvo.
- Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996, Bienes y servicios. Huevo, sus productos y derivados.
- Olmos, J., Paniagua, M. (2014). *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 6 (7), DOI: 10.4172.
- Ortega, R., (1998). El huevo en el contexto de la dieta Mediterránea. *Nutrición Clínica*. 18, 34-37.
- Osimano, A., Aquilanti, L., Clementi, F. (2016). Salmonellosis associated with mass catering: a survey of European Union cases over a 15-year period. *Epidemiology and Infection*. 144, 3000-3012.
- Ozer, N.P., Demirci, A. (2006). Electrolyzed oxidizing water treatment for decontamination of raw salmon inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* Scott A and response surface modeling. *Journal of Food Engineering*. 72, 234–241.

- Payne, J., Gooch, J.E.T, Barnes, E.M. (1979). Heat-resistant bacteria in pasteurized whole egg. *Journal of Applied Bacteriology*. 46, 601-613.
- Pinto, L., Ippolito A., Baruzzi F. (2015). Control of spoiler *Pseudomonas spp.* on fresh cut vegetables by neutral electrolyzed water. *Food Microbiology*. 50, 102-108.
- Petti, C.A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. 44 (8), 1108-1114.
- Rodicio, M.R., Mendoza, M.C. (2004). Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22 (4), 238-245.
- Romanoff, A.L. and Romanoff, A.J. (1949). The avian egg. *New York, USA, John Wiley & Sons Inc.* 918.
- Salas, V. (en proceso) Identificación y caracterización de la actividad antibacteriana producida por dos bacterias ácido lácticas aisladas de un producto cárnico madurado tipo Salami. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM.
- Sayed, M., Abdel-Azeem, M., Farghaly, M., Hassanein, R. (2009). Using of PCR assay for identification of *Listeria monocytogenes* recovered from table eggs. *Veterinary World*. 2 (12), 453-455.
- Schenider, S.R. (2005). Caracterización bioquímica y molecular de las bacteriocinas producidas por *Pediococcus parvulus* MXVK133 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aisladas de productos cárnicos mexicanos. Tesis de Doctorado en Biotecnología, UAM-Iztapalapa.
- Stepień-Pyśniak, D., Marek, A., Rzedzicki, J. (2009). Occurrence of bacteria of the genus *Staphylococcus* in table eggs descended from different sources. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 12(4), 481-484.
- Treviño, M., Moldes, L., Hernández, M., Martínez-Lamas, L., García-Riestra C., Rigueiro, B.J. (2010). Nosocomial infection by VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida*. *Jornal of Medical Microbioly*. 59, 853-855.

- Unión Nacional Avícola (UNA) (2016) Compendio de indicadores económicos del sector avícola. Consultado en línea el 26 de noviembre del 2016. Disponible en <https://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos>.
- Venkitanarayanan, K.S., Ezeike, G.O., Hung, Y.C., Doyle, M.P. (1999). Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4276–4279.
- Vollmer, G., Josst G., Schenker, D., Sturm, N., Vreden N. (1999). Huevos, leche y quesos. *Elementos de Bromatología descriptiva*. Editorial Acribia, 3ra edición. 365- 376.
- Wang, C.Y., Shie H.S., Chen, S.C., Huang, J.P., Hsieh I.C., Wen M.S., Lin F.C., Wu D. (2007). *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *International Journal of Clinical Practice*. 61, 68-73.
- Whiley, H., Ross, K. (2015). *Salmonella* and eggs: From production to plate. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12, 2543–2