



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE HUATUSCO

TESIS

**DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIOLÓGICA EN
HUEVO TIPO ORGÁNICO, INDUSTRIAL Y DE TRASPATIO EN LA
REGION CENTRO-OCCIDENTE DEL ESTADO DE VERACRUZ**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

PRESENTA:

**ROCIO FRÍAS FRÍAS
ARACELI ROSAS HERNÁNDEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

M.en C. MAGDALENA JIMÉNEZ HERNANDEZ

DRA. NOEMI NAVA VALENTE

HUATUSCO, VER.

JUNIO 2019



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



VERACRUZ
GOBIERNO
DEL ESTADO



SEV
Secretaría
de Educación



**VERA
CRUZ**
ME LLENA DE ORGULLO



DET
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
TECNOLÓGICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Huatusco, Ver., a 18 de Junio de 2019

C. ROCIO FRIAS FRIAS
C. ARACELI ROSAS HERNANDEZ
PASANTE DE LA CARRERA DE
ING. EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
PRESENTE.

En relación a su solicitud relativa, me es grato transcribir a usted a continuación que después de haber sido analizado exhaustivamente la **TESIS** titulado:

**"DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIOLÓGICA EN HUEVO TIPO ORGÁNICO,
INDUSTRIAL Y DE TRASPATÍO EN LA REGIÓN CENTRO-OCCIDENTE DEL ESTADO DE
VERACRUZ"**

Se le notifica que a mi juicio este cumple con los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes de la **TESIS**, por lo que se autoriza su impresión.

ATENTAMENTE.

M.M. VÍCTOR MANUEL ARCOS FERIA
DIRECTOR DEL ITSH.

SEP

SEV



**INSTITUTO TECNOLÓGICO
SUPERIOR DE HUATUSCO**
CLAVE 30EIT00132

DIRECCIÓN GENERAL



Avenida 25 poniente núm. 100 Col. Reserva Territorial
Huatusco, Veracruz, México C.P. 94100
Tel. (01 273-734-40-00). e-mail: ite_huatusco@hotmail.com
www.itshuatusco.edu.mx





SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



VERACRUZ
GOBIERNO
DEL ESTADO



SEV
Secretaría
de Educación



DET
Departamento de Estudios
Tecnológicos



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Huatusco, Ver., a 18 de Junio de 2019
Asunto: Liberación del Informe final

ING. CARINA ACOSTA SÁNCHEZ
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
PRESENTE.

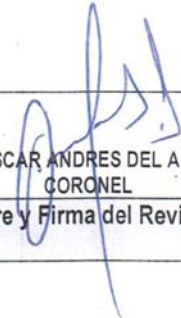
Por este medio les informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la Titulación Integral.

Nombre de los egresados	C. ROCIO FRIAS FRIAS C. ARACELI ROSAS HERNANDEZ
Carrera:	Ingeniería en industrias alimentarias
No. de Control:	133Z0504 133Z0407
Nombre del Proyecto:	Determinación de la carga microbiológica en huevo tipo orgánico, industrial y de traspato en la región centro-occidente del estado de Veracruz
Producto:	I.TESIS

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta actividad para la formación profesional de nuestros(as) egresados(as).

ATENTAMENTE


ING. SALOMÓN LOPEZ SERRANO
JEFE DE CARRERA DE ING. EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

 M.C MAGDALENA JIMENEZ HERNANDEZ	 DRA. NOEMI NAVA VALENTE	 Dr. OSCAR ANDRES DEL ANGEL CORONEL
Nombre y Firma del Asesor (a)	Nombre y Firma del Revisor(a)	Nombre y Firma del Revisor(a)

C.C.P.- División de IIAL - para su conocimiento.
Archivo.



Avenida 25 poniente num. 100 Col. Reserva Territorial
Huatusco, Veracruz, México. C.P. 94100
Tel. (01 273-734-40-00), e-mail: te_huatusco@hotmail.com
www.itshuatusco.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

Rocio Frias Frias

Al personal en general del Instituto Tecnológico superior de Huatusco por permitirnos desarrollar la tesis en las instalaciones y brindarnos los reactivos y materiales necesarios para que esto fuera posible.

Al Doctor Oscar Andrés del Ángel Coronel por brindarnos su tiempo para la realización de este proyecto, por aportar sus conocimientos y apoyarnos durante este proceso.

A la Maestra en Ciencias Magdalena Jiménez Hernández por darnos la confianza y apoyarnos en este proyecto.

DEDICATORIAS

Rocio Frias Frias

A mi padre Carlos Frias Galván por ser mi mejor ejemplo a seguir, por que dio todo de el para que mis hermanas y yo fuéramos profesionistas aunque ya no este con nosotras siempre lo amaremos como él nos enseñó. Un padre cariñoso y amable que siempre nos motivó a seguir adelante a pesar de las adversidades por sus consejos que nunca olvidare te amo papá.

A mi madre Elvira Frias Vargas por ser el pilar de la familia cuando estaba a punto de derrumbarse por su fortaleza y amor.

A mis hermanas Olga Frias Frias y Nancy Frias Frias que me enseñaron que cuando se quiere se puede, a su cariño y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Araceli Rosas Hernández

Al personal en general Instituto Tecnológico Superior de Huatusco por permitirnos realizar las prácticas en sus instalaciones de no haberlo hecho esto no sería posible.

Al Dr. Oscar Andrés del Ángel Coronel y la Maestra Magdalena Jiménez Hernández, por habernos dado la confianza para la realización de este proyecto, por su dedicación, compromiso y apoyo incondicional, aportando todos sus conocimientos para la realización de este trabajo.

A todos mis profesores por apórtame un poco de sus conocimientos, por su apoyo y paciencia en cada clase

Al personal que labora en el laboratorio de ciencias básicas por brindarnos todo el material posible para la realización de este proyecto y por su amabilidad y respeto.

Dedicatoria

Araceli Rosas Hernández

A Dios por bendecirme cada día y llevarme de su mano para poder salir adelante y alcanzar cada una de mis metas.

A mis padres Florentina y Jaime por ser los mejores padres, por todo su esfuerzo para que juntos alcanzáramos esta meta, por su tiempo, su atención y apoyo que me brindaron en cada paso de mi carrera

A mis hermanos. Tomas, Daniel, Venancio, Floritura y Esmeralda por su apoyo, confianza y compañía durante todos los años de mi vida, por ser un gran ejemplo para mí.

A mis mejores amigos Brissa y (Cristian... Depz) por siempre estar conmigo en los buenos y malos momentos, por apoyarme y nunca dejarme caer,

A todos mis amigos que formaron parte de mi carrera profesional. Por haberme enseñado lo poco o mucho que cada uno sabía y nunca dejarme sola, por cada risa, enojo, tristeza que pasamos juntos.

A mi colega roció por siempre apoyarme y apurarme para siempre terminar pronto las cosas, por su compañía en todo este proceso brindándome apoyo en los momentos difíciles.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIOLÓGICA EN HUEVO TIPO ORGÁNICO, INDUSTRIAL Y DE TRASPATIO EN LA REGIÓN CENTRO-OCCIDENTE DEL ESTADO DE VERACRUZ.

Rocío Frías Frías¹ y Araceli Rosas Hernández¹

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico Superior de Huatusco. División de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Av. 25 Poniente No. 100 Col. Reserva Territorial, Huatusco, Ver. C.P. 94100. Correo- e; chio9419-@hotmail.com: ricar_cheli_12@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo fue determinar la carga microbiana en huevo de traspatio, tipo orgánico e industrial de la región centro-occidente del estado de Veracruz. Se evaluó la presencia de microorganismos patógenos en los tres sistemas de producción, para determinar la carga microbiana de cada uno de ellos, esto sirvió para conocer el estado en que se encuentra cada sistema de producción considerando que en un huevo con una alta carga microbiana puede existir diversos microorganismos tales como *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* etc., que provocan infecciones en los humanos. También con esta investigación podemos realzar la importancia de cada uno de estos sistemas apreciando que son fuentes de ingreso económico para las familias de esta región.

Se inició con la recolección de huevos tipo orgánico, industrial y de traspatio que se producen y comercializan en la región centro-occidente del estado de Veracruz.

Las diferentes muestras de huevo se tomaron de la parte interna y externa del huevo (cascaron, clara y yema). Se evaluó la presencia de *Salmonella spp* aplicando el procedimiento de la Norma NOM-114-SSA1-1994. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Además se realizaron pruebas físicas para evaluar si la presencia de defectos físicos en huevo tipo orgánico, industrial y de traspatio puede correlacionarse con la presencia de *Salmonella spp* u otras bacterias.

El grosor de la cascara en los diferentes sistemas de producción mostraron diferencias estadísticamente significativas, los que tuvieron un mayor grosor de cascara fueron los huevo de Traspatio (0.45 ± 0.085 a), mientras que los huevos orgánicos tuvieron un menor grosor (0.416 ± 0.058 b) El análisis físico reflejo en los huevos orgánicos un porcentaje de 9.37% de fracturas mientras que en huevos correspondientes a los otros sistemas no se encontraron fracturas, esto puede atribuirse a el resultado que arrojó el análisis del grosor del cascara de los huevos tipo orgánicos ya que presentaron un menor valor en el parámetro del grosor de la cascara.

Se comparó el número de colonias por el método de vertido en placa del interior y exterior del huevo de los diferentes sistemas de producción, se prepararon las diluciones 0.1 ml 1×10^{-1} a partir de las muestras cultivadas en medio de enriquecimiento selenito cistina, para obtener una mayor concentración del cultivo y contar con colonias aisladas que se pudieran cuantificar y fuera proporcional al cultivo inicial realizado en tubos múltiples, las muestras de los diferentes sistemas de producción de huevos presentan un número de colonias estadísticamente iguales, pero se observó una amplia variabilidad en la desviación estándar en las muestras de los huevos de traspatio.

Los resultados del análisis microbiológico de los diferentes puntos de colecta de huevos tipo orgánico en cascara, el cual se realizó por el método del vertido en placa, mostraron en el análisis de varianza, diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). Con respecto a las muestras de clara y yema el análisis de

varianza no mostro diferencias estadísticamente significativas, pero se observó una notable variabilidad en la Finca de Chilcuahutla (Municipio Totutla) (125 ± 141.42 a).

En los huevos de traspatio existió gran variabilidad en los diferente puntos de colecta en las unidades formadoras de colonias (ufc) en el caso de la clara/ yema. En el caso del cascaron no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$), a su vez los diversos puntos presentaron desviaciones estándar muy altos o bajos que ocasiono que no existiera diferencias ya que los datos estaban demasiado dispersos de la media.

Palabras clave: *Salmonella* spp. Huevo de Traspatio, Huevo Tipo Orgánico, Microorganismos patógenos

DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIOLÓGICA EN HUEVO TIPO ORGANICO, INDUSTRIAL Y DE TRASPATIO EN LA REGION CENTRO-OCCIDENTE DEL ESTADO DE VERACRUZ.

Rocío Frías Frías¹ y Araceli Rosas Hernández¹

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico Superior de Huatusco. División de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Av. 25 Poniente No. 100 Col. Reserva Territorial, Huatusco, Ver. C.P. 94100. Correo- e; chio9419-@hotmail.com: ricar_cheli_12@hotmail.com

ABSTRACT

The main objective of this study was to determine the microbiological load on the backyard egg, organic and industrial type of the central-western region of the state of Veracruz. The presence of pathogenic microorganisms in the three production systems was evaluated, to determine the microbial load of each of them, this served to know the state in which each production system is located considering that in an egg with a high microbiological load it can there are several microorganisms such as *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* etc., which cause infections in humans. Also with this research we can highlight the importance of each of these systems, appreciating that they are sources of economic income for families in this region.

It began with the collection of organic, industrial and backyard eggs that are produced and marketed in the central-western region of the state of Veracruz.

The different egg samples were taken from the internal and external part of the egg (shell, clear and yolk). The presence of *Salmonella spp* was evaluated applying the procedure of Standard NOM-114-SSA1-1994. Method for the determination of

Salmonella in foods. In addition, physical tests were carried out to evaluate if the presence of physical defects in organic, industrial and backyard egg types could be correlated with the presence of *Salmonella spp* or other bacteria.

The thickness of the shell in the different production systems showed statistically significant differences, those that had a greater shell thickness were the backyard eggs (0.45 ± 0.085 a), while the organic eggs had a smaller thickness (0.416 ± 0.058 b)) The physical analysis reflected in the organic eggs a percentage of 9.37% of fractures while in eggs corresponding to the other systems no fractures were found, this can be attributed to the result that I throw the analysis of the thickness of the shell of the organic type eggs and which had a lower value in the thickness parameter of the shell.

The number of colonies was compared by the plate pouring method of the inside and outside of the egg of the different production systems, dilutions 0.1 ml 1×10^{-1} were prepared from the samples cultured in selenite enrichment medium cystine, to obtain a higher concentration of the culture and having isolated colonies that could be quantified and proportional to the initial culture carried out in multiple tubes, the samples from the different egg production systems show a statistically equal number of colonies, but a wide variability was observed in the standard deviation in the samples of the backyard eggs.

The results of the microbiological analysis of the different collection points of organic eggs in shell, which was carried out by the method of pouring into plates, showed in the analysis of variance, statistically significant differences ($P \leq 0.05$). Regarding the white and yolk samples, the analysis of variance did not show statistically significant differences, but a notable variability was observed in the Finca de Chilcuahutla (Totutla Municipality) (125 ± 141.42 a).

In the backyard eggs there was great variability in the different collection points in the colony forming units (cfu) in the case of the clear / yolk. In the case of the shell there

were no statistically significant differences ($P \leq 0.05$), in turn the various points presented very high or low standard deviations that caused no differences since the data were too dispersed from the mean.

Keywords: *Salmonella* spp. Backyard Egg, Organic Type Egg, Pathogenic Microorganisms.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	20
II.	ANTECEDENTES.....	22
III.	MARCO TEORICO	26
3.1	Historia de la producción de huevo en México	26
3.1.1	Producción de huevo para plato en México	26
3.1.2	Principales estados productores de huevo	27
3.1.3.	Consumo de huevo para plato en México.....	29
3.1.4	Principales estados consumidores de huevo para plato.	29
3.1.5	Comportamiento del precio del huevo (2017)	29
3.2	Avicultura de traspatio en México.	32
3.3	Avicultura tipo orgánica en México.....	33
3.3.1	Certificaciones orgánicas.....	33
3.4	Características físicas del huevo.....	35
3.4.1	Estado interno y externo del huevo por medio de la Ovoscopia.	35
3.4.2	Espesor de la cáscara	36
3.5	Características nutricionales del huevo.....	37
3.6	Microorganismos patógenos en el huevo.....	38
3.7	<i>Salmonella spp.</i> en México	39

3.7.2 Características de la <i>Salmonella spp.</i>	40
3.7.3. Agentes infecciosos asociados a la zoonosis	41
3.7.4. Aspectos de salud pública de serotipos de <i>Salmonella spp.</i> causantes de zoonosis.....	41
3.7.5 Mecanismos de transmisión de <i>Salmonella spp.</i> en el huevo.....	42
3.7.5.1 Transmisión horizontal de <i>Salmonella</i>	43
3.7.5.2 Transmisión lateral de <i>salmonella spp.</i>	43
3.8 Comparación de las pared celular de las bacterias gram positivas y Gram negativas.....	44
3.8.1 Estructura de la pared celular de las bacterias grampositivas	44
3.8.2 Estructura de la pared celular de las bacterias gram negativas.....	45
IV. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO	47
V. HIPOTESIS	48
VI. OBJETIVOS	49
6.1 OBJETIVO GENERAL	49
6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	49
VII. MATERIALES Y METODOS	50
7.1 Análisis físicos.....	51
7.1.1 Ovoscopia.....	52
7.2 Determinación de la carga microbiológica para cascaron clara y yema de huevo.	54
7.2.1 Análisis de la clara y yema	55
7.3 Fundamentos de la Tinción de Gram	56
7.4. Enriquecimiento selectivo para cascaron clara y yema.....	58
7.4.1 Tubos múltiples para cascaron, clara y yema.....	59
7.4.2 Vertido en placa.....	61

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION	64
8.1 Análisis físicos de huevo tipo orgánico, industrial y de traspatio.....	64
8.1.1 Ovoscopia en huevo de tres sistemas de producción.....	66
8.2. Análisis microbiológico en cascarón de huevo.....	67
8.2.1. Análisis microbiológico en clara y yema de huevo	69
8.2.2. Comparación de la carga microbiológica en el exterior e interior del huevo	71
8.3 Comparación del número de colonias presentes en placa por el método de vertido en placa del interior y exterior del huevo.	74
8.3.1 Comparación del número de colonias por vertido en placa en diferentes puntos de colecta.....	76
IX. CONCLUSIONES.....	79
X. BIBLIOGRAFÍA.....	81
XI. ANEXOS	87
ANEXO 1.Certificacion Orgánica	87
ANEXO 2. Tinción de gram	89
ANEXO 3. Preparación del buffer de fosfato.....	90

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Precios promedio de huevo blanco y rojo por presentación. Fuente: Profeco. Quién es Quién en los Precios (QQED). Precios promedio del 11 al 15 de septiembre de 2017.....	30
Cuadro 2. Precios promedio de huevo blanco y rojo por entidad federativa y presentación. Fuente: Profeco. Quién es Quién en los Precios (QQED). Precios promedio del 11 al 15 de septiembre de 2017.....	31
Cuadro 3. Composición de la pared celular de Gram positivas y Gram negativas. Fuente: Morfología y estructura bacteriana. <i>Temas de bacteriología y virología médica</i> , 2016.....	57
Cuadro. 4. Comparación de los parámetros físicos del huevo industrial, orgánico y de traspatio. Fuente: Elaboración propia.....	65
Cuadro 5. Determinación de la cámara de aire en huevo industrial, tipo orgánico y de traspatio. Fuente: Elaboración propia.....	67
Cuadro 6. Determinación de la carga microbiológica por espectrofotometría DO 620 para huevos tipo orgánico, industrial y traspatio. Fuente: Elaboración propia.....	68

Cuadro 7. Determinación de la carga microbiológica por espectrofotometría DO ₆₂₀ para huevos orgánicos y de traspatio. Fuente: Elaboración propia.....	70
Cuadro 8. Carga microbiológica en el exterior e interior de huevo orgánico por espectrofotometría DO ₆₂₀ . Fuente: Elaboración propia.....	71
Cuadro 9 Carga microbiológica en el exterior e interior de huevo de traspatio por espectrofotometría DO ₆₂₀ . Fuente: Elaboración propia.....	72
Cuadro 10. Carga microbiológica en el exterior e interior de huevo industrial por espectrofotometría DO ₆₂₀ .Fuente: Elaboración propia.....	74
Cuadro 11. Determinación del número de colonias presentes en cada sistema de producción. Fuente: Elaboración propia.....	75
Cuadro 12.Comparacion del número de colonias de tipo orgánico en los diferentes puntos de colecta. Fuente: Elaboración propia.....	77
Cuadro 13.Comparación del número de colonias de huevo de traspatio en los distintos puntos de colecta. Fuente: Elaboración propia.....	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estados productores de huevo 2017. Fuente: Compendió de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2017.....	28
Figura 2. Producción acumulada de huevo para plato julio 2017 (toneladas) Fuente: SAGARPA. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Boletín mensual de avances de la producción de huevo para julio 2017.....	28
Figura 3. Puntos de recolección de huevo. Fuente: Google Maps.....	51
Figura 4. Ovoscopio. Fuente: Elaboración propia.....	53
Figura 5. Preenriquecimiento del cascaron. Fuente: Elaboración propia.....	55
Figura 6: Preenriquecimiento para clara y yema. Fuente: Elaboración propia.....	56
Figura 7: Comparación de tubos en distintas fases, Testigo, Preenriquecimiento y Enriquecimiento selectivo. Fuente: Elaboración propia.....	59
Figura 8. Diluciones. Fuente: Elaboración propia.....	61
Figura 9: Placa incubada por 24 horas. Fuente: Elaboración propia.....	63

I. INTRODUCCION

El huevo es un elemento esencial, un alimento muy valioso por la equilibrada proporción de proteínas, carbohidratos, grasas, minerales y vitaminas que contiene. El huevo es primordial en la dieta del mexicano, es una fuente de proteína de excelente calidad, superior a la de la leche y la carne (Vollmer, *et al.*, 1999).

En el 2017 México ocupó el primer lugar de consumo de huevo fresco a nivel mundial. El consumo per cápita del mexicano es de 22.7 Kg; casi un huevo al día. (Union Nacional de Avicultores, 2018). México se ubica como el cuarto productor de huevo a nivel mundial, después de China (Union Nacional de Avicultores, 2018).

Por otra parte durante mucho tiempo las enterobacterias pertenecientes al género *Salmonella spp* han sido reportadas como patógenos para humanos y en animales domésticos como también en animales silvestres, tal es el caso de las aves por ejemplo las gallinas que pueden contaminar los huevos que producen de forma interna o externa (Minorl.*et al.*, 1984). Existen más de 2.500 serovariedades de *salmonella entérica* de las cuales unas 250 se han aislado de las aves de corral, y alrededor de 40 serovariedades son las más comúnmente encontradas (Organización Mundial de la Salud, 2017).

La *Salmonella spp*, es un microorganismo que se adapta muy bien a los animales y a las personas, (Gutiérrez *et al.*, 2000). Cuando llega a los alimentos es capaz de multiplicarse en cualquier producto fresco a una velocidad muy elevada. Si los alimentos no se mantienen en condiciones de asepsia; existe la posibilidad que el microorganismo se multiplique aceleradamente, generando riesgo a los consumidores, (Organización Mundial de la Salud, 2017). En los huevos, las

especies de *salmonella* se pueden encontrar en la cascara, pero pueden penetrar en su interior si no se mantiene unas condiciones de conservación adecuadas, (Carbajal, 2006). Para llegar a este alimento estas bacterias emplean diversas vías, una de ellas es cuando están presente en la gallina de donde proviene el huevo, aquí la contaminación se da internamente, (Suárez M.*et al.*, 2000). La otra posibilidad, es que el microorganismo esté presente en la cascara y sus orígenes pueden ser: los animales, las personas que manipulan, distribuyen o estuvieron en contacto con los huevos, (Méndez, *et al.*, 2011).

En este trabajo se determinó la carga microbiológica de cada sistema de producción de huevo, traspatio, tipo orgánico e industrial para conocer la importancia de cada sistema de producción y los riesgos que puede tener. El conocimiento de la carga microbiológica de cada uno de los sistemas permitirá mejorar la producción de los mismos conociendo los puntos críticos a controlar en cada uno de los sistemas de producción.

II. ANTECEDENTES

El instituto tecnológico superior de Huatusco en colaboración con otras instituciones (Centro Regional Universitario Oriente, Universidad Autónoma Chapingo, Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario 279.) en el 2016, realizaron un estudio con la finalidad de evaluar parámetros sensoriales, fisicoquímicos y preferencias de consumo de huevo de gallina de traspatio, orgánico e industrializados en la región cafetalera central de Veracruz, México. Se colectaron muestras de 30 huevos de cada tipología, considerando los criterios de calidad establecidos por la norma mexicana NMX-FF- 079-SCFI-2004 (Secretaría de Economía, 2004) referente a las características físicas que debe cumplir el “huevo fresco clasificado de gallina”, producido y comercializado en territorio nacional, entre los resultados que obtuvieron en las condiciones bajo las cuales se realizó el presente estudio, los huevos de traspatio reunieron mayor número de parámetros de calidad que los de procedencia industrial. Aunque los huevos de traspatio convencionales son los más frescos y atesoran buenos índices de albúmina y yema, les resta a la calidad total el hecho de ser más pequeños, menos pesados y menos limpios del cascarón que los huevos industriales. Respecto a la evaluación sensorial se observó una marcada tendencia a preferir los huevos procedentes de sistemas de producción industrializados (Del Ángel-Coronel *et al.*, 2016).

En el estado de Michoacán, México (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) se determinó la calidad del huevo de gallinas criollas criadas en traspatio,

recolectado en la zona centro. Se colectaron 385 huevos de 11 municipios (35 huevos/municipio). Las mediciones realizadas fueron: peso del huevo (PH), diámetro longitudinal (DL) del huevo, diámetro transversal (DT) del huevo, peso de la cáscara (PC), espesor de la cáscara (EC), índice de cáscara (IC), diámetro de clara (DC), diámetro de yema (DY), altura de clara (AC), altura de yema (AY), altura de la cámara de aire (ACA), unidades Haugh (UH) y pigmentación de yema (PY). Los promedios obtenidos fueron: PH 50.7 g; DL 5.6 cm; DT 4.2 cm; PC 4.5 g; EC 0.28 mm; IC 8.9%; DC 10.0 cm; DY 4.5 cm; AC 6.3 mm; AY 1.6 cm; ACA 5.4 mm; unidades Haugh, 73.4 y PY 12.1. Se encontraron diferencias en las características de los huevos entre localidades. El peso del huevo de gallinas criollas presentó un alto coeficiente de variación. En conclusión el huevo de gallinas de traspatio presenta dimensiones reducidas, en comparación con el huevo comercial. Sin embargo, los indicadores de calidad interna sugieren que el huevo de gallinas de traspatio tiene calidad similar al de gallinas de la estirpe comercial (Juárez-Caratachea *et al.*, 2010).

En la ciudad de México se realizó un estudio para identificar *Salmonella enteritidis* en huevo para el consumo. Se muestrearon 400 huevos de 10 marcas comerciales. Se obtuvieron 131 aislamientos considerados en 12 diferentes géneros bacterianos: *Acinetobacter spp*, *Alcaligenes spp*, *Bacillus spp*, *Branhamella spp*, *Edwardsiella spp*, *Hafnia spp*, *Klebsiella spp*, *Serratia spp*, *Shigella spp*, *Staphylococcus spp*, *Yersinia spp*, y obteniendo una cepa de *Salmonella enteritidis*, la cual se clasificó como no tipificable. Veinte aislamientos no pudieron ser clasificados. Se obtuvo un huevo contaminado por *S. enteritidis*, el cual en porcentaje del muestreo representó el 0.25 %; sin embargo se encontraron además 11 géneros bacterianos contaminantes que pudieran representar un riesgo para la producción avícola y la salud pública (Mancera Martínez *et al.*, 2005).

Ramírez & Rodríguez, (2013) realizaron la “Detección de enterobacterias en huevos procedentes de 5 granjas avícolas en occidente de Nicaragua” Al realizar

el aislamiento de Enterobacterias en 66 muestras de huevo procedentes de 5 granjas avícolas del occidente de Nicaragua, se encontró que el cascaron presentaba un 78.8% de contaminación bacteriana y clara/yema 39.4 %. Respecto al aislamiento de Enterobacterias en cascaron, se encontró *E. coli* en un 40.7%, *Enterobacter spp* 24.1%, *Klebsiella spp* 11.1 %, *Proteus spp* y *Acinetobacter spp* en 5.6%, *Salmonella spp*, *Citobacter spp* y *Shiguella spp* 3.7%, *Serratia spp* 1.9 %

Estrada & Valencia,(2012) realizaron la “Determinación de *salmonella spp.* En huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito”. En ninguna de las muestras se confirmó la presencia de *Salmonella spp*, pero se evidenciaron bacterias entéricas y ambientales como: *Pseudónima spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea spp.*, *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Aeromona spp* y *Burkholderiacepacia*.

Sanchez, (2013) realizó la “Determinación de la prevalencia de enterobacterias del género *salmonella spp.* En huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la provincia de Tungurahua” de las 50 granjas analizadas, luego de la división por etapas, se obtuvieron 150 muestras en total. De las 150 muestras, se logró aislar *Salmonella spp.* Existente en huevos frescos en granjas avícolas de la provincia de Tungurahua, siendo del 0.0133% (2/150), la primera pertenecía a la etapa de producción inicial y la segunda muestra positiva correspondía a la etapa de producción intermedia de huevos; no se evidenciaron crecimiento en ninguna de las muestras tomadas en la fase final de producción de huevos.

En el año 2016 en la Universidad de Oviedo, España se realizó un estudio “Microbiota en huevos y derivados: identificación y desarrollo. En primer lugar se realizó la caracterización de la microbiota nativa presente en diferentes tipos de huevos comerciales, se analizó también el transporte de microorganismos a través de la cascara, para ello se empleó técnicas moleculares, así como técnicas de cultivo en placa y microscópicas. De acuerdo a los resultados obtenidos los huevos comerciales mostraron una gran variabilidad de microbiota en la cascara,

destacando en huevos camperos que en huevos procedentes de gallinas enjauladas. Respecto al transporte a través de la cascara, se observó que los microorganismos tienden a adherirse a la superficie del huevo pudiendo atravesar con facilidad las barreras protectoras naturales del mismo y multiplicándose así en el interior del huevo. La bacteria modelo (*Staphylococcus warneri*) que se utilizó demostró que la clara líquida tiene un efecto antimicrobiano, mientras que en la yema los microorganismos se multiplican rápidamente (Neira Solís, 2016).

III. MARCO TEORICO

3.1 Historia de la producción de huevo en México

La avicultura es la rama de la ganadería con mayores antecedentes históricos en México, ya que desde antes del arribo de los españoles al continente americano se practicaba la cría de aves de corral principalmente guajolotes o pavos (Vásquez *et al.*,1994). Con el arribo de los colonizadores se introdujeron a los territorios conquistados variedades de aves, que fueron adaptadas a las condiciones de México (Oteiza *et al.*,1997). En 1920 se montan las primeras granjas con fines comerciales. A partir de la segunda mitad de la década de los años 80's se observa un cambio importante en cuanto a los sistemas productivos, con una clara tendencia a la tecnificación (Garcia *et al.*, 2012).

3.1.1 Producción de huevo para plato en México

En el 2017 la producción de huevo fue de 2.8 millones de toneladas y la de pavo 9 mil 687 toneladas. Con 125 millones de cajas, México se ubica como el cuarto productor de huevo a nivel mundial, después de China (1,090 millones de cajas), EUA (243 millones de cajas) e India (215 millones de cajas; nuestro país se encuentra por encima de Japón, Rusia, Brasil, Turquía e Irán. Es importante acotar que cada caja de huevo contiene 360 unidades (30 docenas de huevos) (Union Nacional de Avicultores, 2018).

La comercialización del huevo fresco para consumo, conocido también como huevo para plato, suele hacerse a través de tres vías principales: el 79% se comercializa a granel en los mercados tradicionales y centrales de abasto, el 14% en tiendas de autoservicio en envases cerrados y el 7% restante, se destina al uso industrial (Union Nacional de Avicultores, 2018).

3.1.2 Principales estados productores de huevo

Existe una elevada concentración de la producción de huevo en México en los estados de Jalisco, Puebla, Sonora y Nuevo León en estos estados se genera el 78.8% de ésta. En el estado de Jalisco, la mayor concentración de granjas se da en los municipios de San Juan de los Lagos, Acatic, Tepatitlán y Lagos de Moreno, mientras que en Puebla, la concentración de granjas se presenta en el municipio de Tehuacán.

El criterio para el establecimiento de granjas, de acuerdo con Proteína Animal (Proan), la empresa líder en el mercado, es la equidistancia entre los diferentes mercados más importantes en el país, ya que para ellos la ubicación les permite entregar en un día a cualquier mercado en el territorio nacional (Industria avícola, 2012).

Las principales empresas productoras de huevo que lideran el mercado en México son San Juan, Bachoco, Allende y Alvisa (Sanchez, 2017). El estado de Jalisco en el 2017 fue el principal productor de huevo con 54.9% del total nacional, seguido por Puebla, Sonora, Yucatán y Nuevo León. De acuerdo con información proporcionada por la FAO, dentro del sector pecuario mexicano, la aportación de la proteína del huevo al mercado es de 17 por ciento. Asimismo, la industria de huevo en México se ubica principalmente en: Jalisco (54%), Puebla (13%), Sonora

(8%), La Comarca Lagunera (5%), Yucatán (5%), Nuevo León (3%) y Guanajuato (2%) (Union Nacional de Avicultores, 2018).

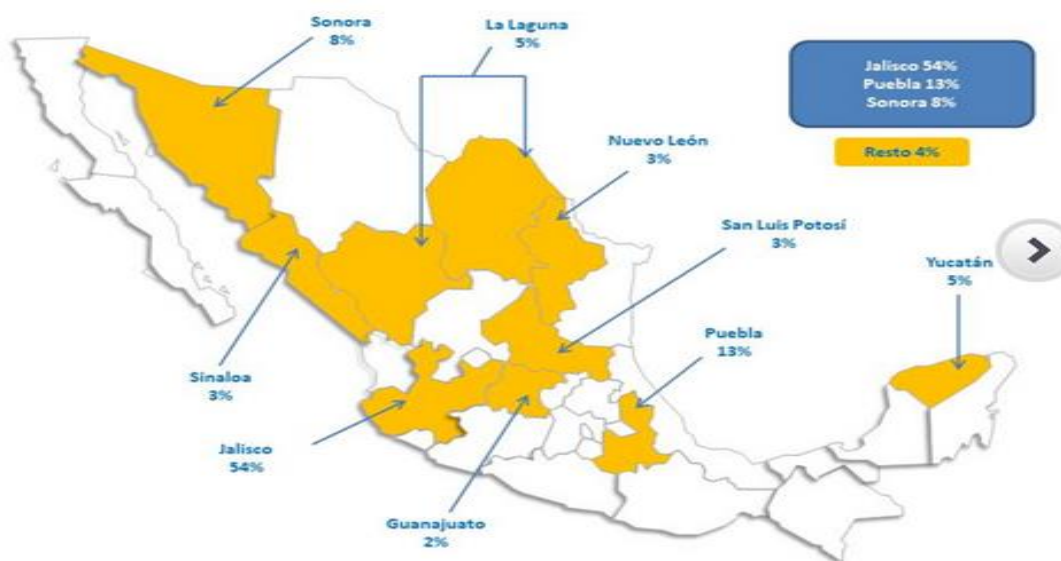


Figura 1. Estados productores de huevo 2017

Fuente: Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2017

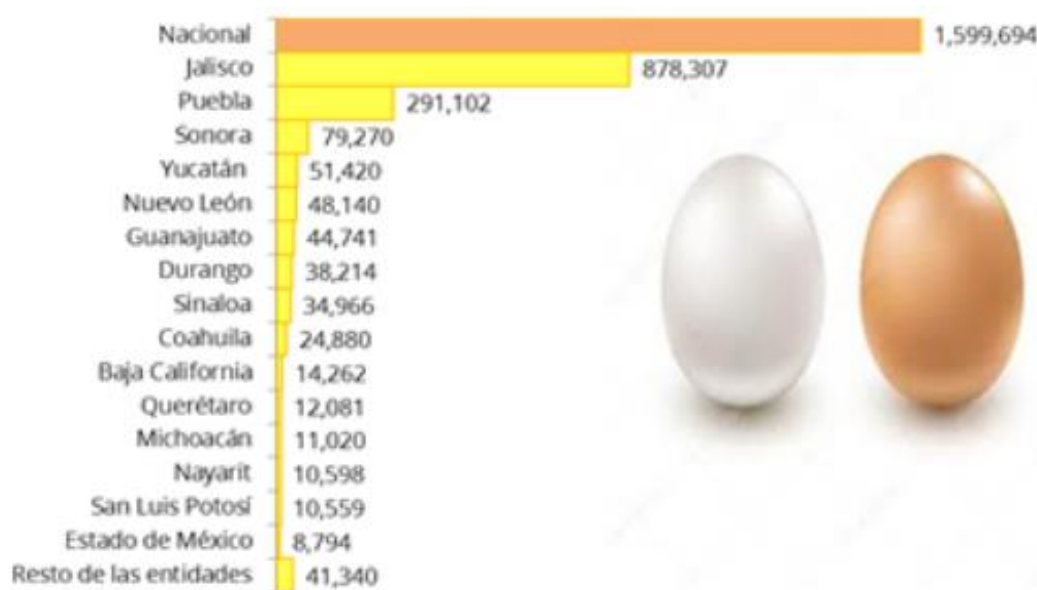


Figura 2. Producción acumulada de huevo para plato julio 2017 (toneladas)

Fuente: SAGARPA. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Boletín mensual de avances de la producción de huevo para julio 2017.

3.1.3. Consumo de huevo para plato en México

Las razones de la importancia en el consumo y en los volúmenes de producción del huevo para plato, se debe a que el precio del huevo es más económico que cualquiera de las otras fuentes de proteína animal y, sin embargo, es una fuente de proteína nutritiva y barata, además de ser de gran aceptación (Monroy *et al.*, 2012).

En huevo fresco en el 2017, México es el principal consumidor de nivel mundial. El consumo *per cápita* del mexicano es de 22.7 Kg; casi un huevo al día. En segundo lugar se encuentra Rusia con 18.44 Kg; en tercer lugar Colombia con 16.38 kg; Argentina en cuarto lugar con 15.56 Kg, y en quinto Nueva Zelanda con 14.69 Kg (Avicultores, 2018).

3.1.4 Principales estados consumidores de huevo para plato.

El huevo es un alimento primordial en la dieta del mexicano, es una fuente de proteína de excelente calidad, superior a la de la leche y la carne (Torre, *et al.*, 2012); sin embargo, también es considerado un alimento con alto contenido en colesterol (McGee, *et al.*, 2007). A partir de los años setenta se generó la creencia de que el colesterol de la dieta causaba un incremento del colesterol en la sangre, por lo que recomendaciones fueron dirigidas a reducir el consumo de huevo. Pero las últimas recomendaciones señalan que la ingesta moderada de este alimento no incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (IEH., 2009).

3.1.5 Comportamiento del precio del huevo (2017)

De acuerdo con información del programa Quién es Quién en los Precios (QQP) de Profeco, (Procuraduría Federal del Consumidor) los precios mínimos, máximos y promedios del huevo blanco y rojo de la semana del 11 al 15 de septiembre de 2017, son los que se presentan el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Precios promedio de huevo blanco y rojo por presentación.

<i>Presentación</i>	<i>Precio Mínimo (\$)</i>	<i>Precio Máximo (\$)</i>	<i>Precio Promedio (\$)</i>
Huevo blanco, paquete con 12 piezas	14.60	30.00	21.47
Huevo blanco, paquete con 18 piezas	22.70	42.00	31.26
Huevo rojo, paquete con 12 piezas	16.05	27.90	22.27
Huevo rojo, paquete con 18 piezas	27.25	42.90	33.19

Fuente: Profeco. Quién es Quién en los Precios (QQED). Precios promedio del 11 al 15 de septiembre de 2017.

Cuadro 2. Precios promedio de huevo blanco y rojo por entidad federativa y presentación

Entidad	<i>Paquete de 12 piezas</i>		<i>Paquete de 18 piezas</i>	
	Huevo blanco	Huevo rojo	Huevo blanco	Huevo rojo
Aguascalientes	20.02	21.22	30.36	32.36
Baja california	22.63	22.81	33.92	35.11
Baja california sur	23.12	22.41	33.80	32.40
Campeche	23.73		33.00	
Chiapas	20.83	20.80	28.25	31.44
Chihuahua	22.64		34.62	
Coahuila	21.61	20.50	32.50	31.00
Colima	26.40	24.15	37.48	
Ciudad de México	20.79	22.09	30.82	33.02
Durango	21.50	22.60	31.63	33.45
Guanajuato	21.20	23.61	30.68	35.08
Guerrero	21.56	22.48	30.90	32.31
Hidalgo	21.60	21.89	31.04	33.05
Jalisco	23.82	22.35	34.16	33.28
Estado de México	20.59	21.91	30.58	33.07
Michoacán	22.02	23.27	31.26	33.64
Morelos	20.98	21.79	29.97	33.03
Nuevo León	19.90	19.93	27.87	29.50
Oaxaca	20.32		28.62	
Puebla	21.49	22.24	30.28	33.56
Querétaro	20.42	22.57	29.83	33.13
Quintana Roo	22.18		30.81	
San Luis Potosí	20.36	22.33	29.33	33.83
Sinaloa	24.10	24.10	35.80	35.80
Sonora	24.66	25.14	35.68	36.96
Tabasco	20.48	20.81	29.30	32.72
Tamaulipas	22.92		34.18	
Tlaxcala	21.50	24.50	31.13	34.50
Veracruz	20.28	20.90	29.75	30.80
Yucatán	23.38		33.50	
Zacatecas	20.60	22.46	27.48	31.57

Fuente: Profeco. Quién es Quién en los Precios (QQED). Precios promedio del 11 al 15 de septiembre de 2017.

Una forma de medir la variación del precio del huevo, así como de otros productos y servicios representativos en el consumo de los hogares, es a través del índice Nacional de Precios al Consumidor (INPC). En los últimos años, el precio del huevo ha registrado variaciones significativas en la inflación anual; es decir, la variación de un periodo respecto al mismo del año anterior. La disminución del precio del huevo presentada a partir de 2013 obedece, en parte, al Decreto por el que se estableció un arancel cupo a las importaciones de huevo, es decir, se incrementó la importación. El objeto de esta medida fue estabilizar el precio del mercado que alcanzó un incremento considerable y un golpe al bolsillo de las familias (Procuraduría Federal del Consumidor, 2017).

3.2 Avicultura de traspatio en México.

La avicultura de traspatio forma parte del sistema de producción pecuaria que realizan las familias rurales en el patio de sus hogares, el cual consiste en criar aves con insumos producidos por los productores y lo que las aves encuentran durante el pastoreo (Juárez-Caratachea *et al*, 2010). De todas las especies que se crían en este sistema, los pollos locales (pollos de traspatio) son los más importantes debido a su prolificidad, corto ciclo y bajo costo de producción, además, representa una tradición familiar (Camacho-Escobar, *et al.*, 2006).

El manejo y alimentación de los pollos de traspatio es realizado principalmente por amas de casa, niños y ancianos (Cuca-García *et al.*, 2011) La principal razón para la crianza de los pollos de traspatio es el consumo y la venta, la cual les permite a las familias generar ingresos económicos (Camacho *et al.*, 2006)

La alimentación de las aves adultas está basada en maíz, restos de comida y masa, mientras que los pollitos se les ofrece alimento comercial (Fundamentos de producción agrícola, 2017)

3.3 Avicultura tipo orgánica en México.

Los huevos orgánicos son aquellos que se producen bajo las normas internacionales orgánicas. Los productos que consumen las gallinas y pollos se deben producir en la misma granja sin aplicación de pesticidas (Insecticidas, fungicidas y herbicidas (SIAP., 2017).

México es nuevo en la legislación de productos orgánicos, actualmente se trabaja bajo la Ley de Productos Orgánicos, publicada en 2006; siendo la SAGARPA, la entidad federal que certifica este tipo de alimentos.

3.3.1 Certificaciones orgánicas

3.3.1.2 Generalidades sobre el sistema de certificación BIOAGRICERT

La certificación de la agricultura orgánica entra bajo un sistema de certificación de producto reglamentado, que obliga al respecto de la normatividad de agricultura orgánica vigente en el país de producción y en el país de destino de los productos, según la norma ISO/IEC 17065(Bioagricert, 2013).Este sistema de certificación Bioagricertes aplicada en la Finca orgánica de Guayacán en Guadalupe, Jalisco que produce huevo tipo orgánico, está construido bajo los siguientes principios:

1. La calidad de un producto es el resultado de un proceso que incluye las etapas de producción, control de las actividades desarrolladas y de los resultados obtenidos.
2. Solamente la evaluación del entero proceso puede proporcionar garantías válidas para que el producto este conforme a los requisitos especificados.

3. El organismo de certificación no substituye al Operador, el cual debe cumplir con las responsabilidades primarias de realizar y manejar el producto en conformidad a los requisitos de certificación, de averiguar las actividades desarrolladas y los resultados obtenidos.
4. Es tarea del organismo de certificación de averiguar la capacidad del Operador de respetar cuanto este indicado.
5. Es el Operador que tiene que proporcionar una evidencia objetiva del respecto de los requisitos especificados;
6. Los requisitos objetivos del control deben ser expresado en términos medibles y averiguables. La vigilancia sobre el sistema de certificación y sobre la actividad desarrollada por Bioagricert se hace por las *Autoridades Competentes* y por los *Organismos de acreditación (ACCREDIA eIOAS)*.

La vigilancia sobre el sistema de certificación y sobre la actividad desarrollada por Bioagricert se hace por las Autoridades Competentes y por los Organismos de acreditación (ACCREDIA eIOAS). El sistema de certificación operado para Bioagricert se compone de los siguientes elementos entre los previstos para la norma ISO/IEC 17065:

- La evaluación del proyecto y si aplicable, del sistema de gestión de la empresa;
- La evaluación del proceso: averiguación de la capacidad del proceso de producir, de manera regular, productos conformes a los requisitos especificados (el producto certificado es la conclusión de un ciclo, del cual es el proceso de producción que debe ser evaluado); (Bioagricert, 2013).

3.3.2.2 Certificación gallina libre de jaula

El modelo se desarrolla en etapas, iniciándose con la creación de una empresa avícola dedicada a la cría de ponedoras, producción de huevos *free range* a la introducción de este producto en el mercado nacional. Tras una primera etapa en que la empresa ha acumulado una experiencia productiva y validado la aceptación de su producto en el mercado, se inicia el desarrollo de un Modelo de Gestión Asociativa, el que procede a validar con la ejecución de un proyecto piloto apoyado por FIA. El proyecto contempla la participación de tres pequeños agricultores como productores asociados, con quienes la empresa desarrolla modos de gestión productiva conjunta y acredita a ambas partes en programas de certificación internacionalmente reconocidos. Esta iniciativa es una fase de construcción de confianzas entre la empresa y sus asociados, prueba que es posible adoptar un modelo asociativo como el descrito, con rendimientos aun por sobre la norma y así dar cumplimiento a una normativa de calidad compleja y con altos niveles de exigencia (Rodríguez Schuller *et al*, 2010)

3.4 Características físicas del huevo

3.4.1 Estado interno y externo del huevo por medio de la Ovoscopia.

La ovoscopia es un método que se basa en la translucidez de la cáscara y en las diferencias de transmisión lumínica que presentan las estructuras internas del huevo, modificadas más o menos según las alteraciones. El huevo debe colocarse ante el foco luminoso en posición vertical. El interior del huevo queda completamente iluminado y la cáscara muestra su estructura porosa, estando influenciada la observación por el color de la cáscara. El huevo fresco aparece en el ovoscopio de color amarillo rosado claro (Aguinaldo *et al.*, 2016).

Cáscara: En la cáscara se pueden apreciar las grietas o fisuras, manchas y los defectos de calcificación como los depósitos de cal y las calcificaciones defectuosas. Las manchas de sangre internas aparecen como sombras de colores oscuros o rojizos. En los huevos con la yema adherida a la cáscara, la yema aparece inmóvil dando una sombra más oscura en la zona de contacto (Caston *et al.*, 2001).

Cámara de aire: En el ángulo obtuso se puede apreciar la cámara de aire del huevo, y su altura nos indica la edad del huevo. En el huevo fresco (recién puesto) la cámara de aire presenta una altura de 3 mm, pero aumenta conforme pasa el tiempo desde la puesta. En huevos de 1 a 4 semanas la cámara de aire presenta una altura comprendida entre 4 y 6 mm, en huevos de 6 semanas a 4 meses la cámara de aire supone $\frac{1}{6}$ del huevo y su altura está comprendida entre 11 y 18 mm y para los huevos de más de cuatro meses la cámara de aire ocupa un tercio del huevo (Instituto de Estudios del Huevo., 2004).

3.4.2 Espesor de la cáscara

Los huevos con cáscara delgada y muy porosa están sujetos a una evaporación más intensa, pierden peso con mayor rapidez, y en consecuencia son de calidad más baja que los que poseen la cáscara gruesa y poco porosa.

Durante el almacenamiento la cáscara se seca ya que la sustancia viscosa de los poros se evapora y como consecuencia los canalículos que atraviesan la cáscara se agrandan. Esta medición se realiza con micrómetro o pico de rey. Huevos de menos de 0.35 mm son poco apropiados para la comercialización por su fragilidad (Caston *et al.*, 2001).

3.5 Características nutricionales del huevo

El huevo es fuente apreciable de vitamina A (100 g de parte comestible aportan un 28,4% de la Cantidad Diaria Recomendada -CDR-), vitamina D (36%), vitamina E (15,8%), riboflavina (26,4%), niacina (20,6%), ácido fólico (25,6%), vitamina B12 (84%), biotina (40%), ácido pantoténico (30%), fósforo (30,9%), hierro (15,7%), zinc (20%) y selenio (18,2%). Ello hace del huevo un alimento nutricionalmente denso: rico en componentes nutritivos y con muy pocas calorías. (Azcona *et al.*, 2006)

La proteína del huevo se considera una fuente de proteína altamente digestible ya que más del 95% de la proteína del huevo digerida y resulta disponible para cubrir las distintas necesidades del organismo (Millward *et al.*, 2004). Su calidad supera incluso a la proteína de la leche, pescado y carne (Vollmer *et al.*, 1999).

Aunque la mayor parte de los alimentos ricos en colesterol suelen ser también ricos en grasas saturadas, el huevo no lo es. Un huevo tiene unos 200 mg de colesterol (Simopoulos *et al.*, 1992).

En concreto, diferentes estudios realizados han demostrado que no existe una asociación entre el consumo de huevos y la aparición y desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Natoli S *et al.*, 2007); (Qureshi *et al.*, 2007).

En el huevo se encuentran cantidades abundantes de vitaminas, en especial vitamina B12, biotina, ácido pantoténico, riboflavina, vitamina D, niacina, vitaminas A, E y B1. Una ventaja de este alimento es que contiene tanto vitaminas hidrosolubles como liposolubles, que pueden ayudar a cubrir una parte considerable de las necesidades diarias (Instituto de Estudios del Huevo., 2004).

La biotina es otro nutriente esencial que se encuentra en el huevo, vinculado a la protección de la piel y al mantenimiento de las funciones corporales. Y aunque la microbiota intestinal es capaz de sintetizar y aportar esta vitamina al organismo, el

consumo durante la lactación está recomendado para contrarrestar las pérdidas a través de la leche (Gil A *et al.*, 2010).

Luteína y zeaxantina son los vegetales (espinacas, col rizada, brécol, maíz, calabaza, etc.) (Chung *et al.*, 2004), pero la yema de huevo es la única fuente de origen animal. Aunque la cantidad es menor que la de los vegetales, sin embargo, estudios recientes indican que su biodisponibilidad, comparada con la de otros alimentos o suplementos, es mayor (Handelman GJ *et al.*, 1999).

3.6 Microorganismos patógenos en el huevo.

Existen múltiples factores que inciden en la contaminación: la carga microbiana de la cáscara (número y tipo de microorganismos presentes), las condiciones de almacenamiento y manipulación (temperatura ambiente, humedad relativa, composición de la atmósfera) y factores intrínsecos del huevo, como pH, nutrientes y barreras físicas y químicas (Gil Á *et al.*, 2010).

La contaminación del huevo por agentes infecciosos patógenos para el hombre; Suelen ser la *Salmonella spp*, procedente de las heces, que suele penetrar a través de la cáscara y en ocasiones por vía transovárica; *Staphylococcus spp*, y *Listeria monocytogenes*, que podría causar graves infecciones en este producto (Khan *et al.*, 2009).

El huevo que se destina la obtención de productos líquidos y/o deshidratados debe someterse a pasteurización u otro tratamiento para garantizar la inocuidad del producto, es decir que se logre una reducción de aproximadamente 10⁵ UFC/ml de *Salmonella* NOM-159-SSA1-2016.

3.7 *Salmonella spp.* en México

De los alimentos de consumo popular en México están el frijol, el maíz y el huevo. Dentro de estos, el huevo como producto de origen animal es uno de los alimentos de uso común en el consumo humano como fuente rica en proteínas (Quintín Olascoaga *et al.*, 1983).

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella spp.* Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero (Mussaret B. *et al.*, 2006). La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *Salmonella spp.* en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que cada una de estas entraña para la salud de los seres humanos. Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias, para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella spp.*

Una forma particular de infección por *Salmonella spp.* en el humano es la fiebre tifoidea, la cual es causada por la ingestión e invasión intestinal por un serotipo específico de *Salmonella entérica*, el serovar *Typha* (*S. typha*), que produce una infección sistémica (Everest, *et al.*, 2001). De hecho, las salmonelosis producidas por otros serotipos causan comúnmente una gastroenteritis aunque, pueden presentar cuadros invasivos. Aquí surgen preguntas muy interesantes, como las referentes a conocer si hay determinantes genéticos de la salmonella no-Typhi para los cuadros invasivos y si algunos de estos determinantes se comparten con *S. Typhi*.

Anualmente, en el mundo hay al menos 16 millones de casos de fiebre tifoidea, resultando en 600,000 muertes. En México se han reportado alrededor de 15 mil

casos al año de fiebre tifoidea. Es relevante insistir, que esta incidencia se basa primordialmente en una valoración clínica, sin que se hayan aplicado métodos confiables de diagnóstico. Esto implica, por tanto, un grado de incertidumbre en la estadística (Valdespino-Gómez, *et al* 1994).

En el 2006 Mussaret y colaboradores establecieron un sistema de vigilancia activa, que incluyó solamente a los Estados de Yucatán, San Luis Potosí, Michoacán y Sonora, colectaron, entre 2003 y 2005, 1,882 muestras de intestinos de pollo, cerdo y bovino en rastros. *Salmonella enteritidis* se aisló casi exclusivamente de pollo (11.9% de todas las serovariedades aisladas en este animal); en bovino y cerdo, el aislamiento de esta serovariedad apenas alcanzó el 0.1%. (Mussaret B. *et al.*, 2006)

3.7.2 Características de la *Salmonella* spp.

Los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* son bacilos gramnegativos, incluidos en el grupo de las enterobacterias. Hasta la fecha se han identificado 2500 serotipos o serovares diferentes en dos especies, *Salmonella bongori* y *S. entérica*. (salud, 2017).

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del hombre y los animales causada por microorganismos de dos especies de *Salmonella* (*Salmonella entérica* y *S. bongori*). Aunque fundamentalmente son bacterias intestinales, *Salmonella* está muy distribuida en el ambiente y se encuentran con frecuencia en vertidos de granjas, en las aguas residuales humanas y en cualquier material con contaminación fecal (Bleem *et al.*, 1991).

En el hombre, los microorganismos del género *Salmonella* spp son agentes etiológicos de infecciones intestinales y sistémicas, por lo general, como contaminantes secundarios de los alimentos, de origen animal y ambiental o, frecuentemente, como consecuencia de la infección subclínica en animales de

abasto que provoca la contaminación de la carne, los huevos y la leche o la contaminación secundaria de frutas y verduras que se han fertilizado o regado con desechos orgánicos. La salmonelosis humana es una de las enfermedades zoonóticas más frecuentes y de mayor impacto económico causadas por estos microorganismos (Minorl *et al.*, 1984).

3.7.3. Agentes infecciosos asociados a la zoonosis

Zoonosis (del griego zoon: animal) son enfermedades infecciosas transmisibles desde animales vertebrados al ser humano bajo condiciones naturales. Los agentes infecciosos involucrados incluyen bacterias, virus, parásitos, hongos y rickettsias, entre otros (Dabanch, 2003).

Los agentes infecciosos involucrados en zoonosis pueden ser transmitidos por distintos mecanismos entre ellos, por contacto directo, ingestión, inhalación, por vectores intermediarios o mordeduras. Ciertos agentes pueden ser transmitidos por más de un mecanismo, por ejemplo, *Salmonella spp.* (Dabanch, 2003).

3.7.4. Aspectos de salud pública de serotipos de *Salmonella spp.* causantes de zoonosis.

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial, de origen alimentario debido a que los alimentos contaminados constituyen el principal modo de transmisión (Caffer *et al.*, 2006).

El principal reservorio de *Salmonella spp.* se encuentra en los animales y los microorganismos son transmitidos al hombre, ya sea directamente o a través de productos alimenticios contaminados de origen animal, tales como: huevos crudos

o parcialmente cocidos y sus productos; carne roja y sus derivados; carne de aves de corral; leche cruda y productos lácteos (Caffer *et al.*, 2006)

La principal manifestación clínica es una gastroenteritis aguda, acompañada de cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos (Caffer *et al.*, 2006).

Las bacterias del género *Salmonella spp* se multiplican y colonizan el intestino delgado, invadiendo posteriormente los tejidos, produciendo entero toxinas, causando inflamación y consecuentemente diarrea. Cuando el patógeno vence el sistema de defensa de su hospedador, puede alcanzar el flujo sanguíneo y/o el sistema linfático, causando una enfermedad más severa. Los niños, ancianos o aquellos que padecen enfermedades crónicas son los más vulnerables a la salmonelosis (Bell *et al.*, 2002).

3.7.5 Mecanismos de transmisión de *Salmonella spp.* en el huevo.

El contenido interno de los huevos recién puestos es generalmente estéril. Al momento de la ovoposición, los huevos tienen cierto grado de contaminación en la superficie debido al paso a través de la cloaca de la gallina. (Rincon, 2011)

Entre las bacterias encontradas en los huevos existen representantes de géneros tales como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Staphylococcus* (Musgrove M.T *et al.*, 2008).

3.7.5.1 Transmisión horizontal de *Salmonella spp.*

También conocida como transcascárida la contaminación se produce después de la puesta y es debida mayoritariamente a causas ambientales y a la presencia de deposiciones fecales en la cáscara. Una vez que la superficie del huevo está contaminada, esta puede empezar a penetrar en el interior pasando al albumen y posteriormente a la yema. Esta vía de contaminación es la mayoritaria del huevo (Avicultura,2018).

Después de que está formado el cascarón, *Salmonella spp.* Se establece en el interior del huevo antes de que se desarrolle en la superficie la barrera de proteína que previene la invasión de bacterias, lo cual permite que este microorganismo colonice y sobreviva en el contenido interno del huevo(De Reu K *et al.*, 2006).

3.7.5.2 Transmisión lateral de *salmonella spp.*

Es una ruta de infección que ocurre por contaminación a través del alimento, agua, e instalaciones o vectores, como por ejemplo, aves silvestres, roedores, animales domésticos y humanos. La penetración al interior del huevo por *Salmonella spp* y otras bacterias aumenta con la duración del contacto con material contaminado, especialmente durante el almacenamiento a altas temperaturas y alta humedad relativa (Kaiser M *et al.*, 2001).

La presencia de *Salmonella enteritidis* en el ambiente de las granjas de gallinas ponedoras generalmente es aceptada como una indicación sensitiva y relevante de los huevos contaminados que pueden producirse. El potencial de la circulación del aire para diseminar patógenos en ranchos avícolas es un factor importante en la contaminación de los huevos, esto se ha demostrado en algunos estudios que reportan la presencia de *Salmonella enteritidis* en el aire (Gast R. K *et al.*, 2004).

El Género *Salmonella* agrupa a más de 2,500 serotipos, de los cuáles sólo algunos son patógenos. Algunos infectan sólo al ser humano, por ejemplo *Salmonella typhi* que causa la fiebre tifoidea y *Salmonella paratyphi* que causa la fiebre paratifoidea. Otros serotipos infectan animales y al ser humano, entre ellos se encuentra *Salmonella enteritidis*.

3.8 Comparación de la pared celular de las bacterias gram positivas y Gram negativas

3.8.1 Estructura de la pared celular de las bacterias grampositivas

La gruesa pared celular de las bacterias grampositivas está constituida principalmente por peptidoglicano. Se cree que ésta gruesa capa de peptidoglicano es la determinante de que estas bacterias retengan el cristal violeta de la coloración de Gram. Sin embargo, estas células contienen también una gran cantidad de ácido teicoico: polisacáridos que se unen al ácido N-acetilmurámico o a los lípidos de la membrana plasmática. En este último caso se denomina ácido lipoteicoico. Tanto los ácidos teicoicos como los lipoteicoicos, tienen la función de estabilizar la pared celular. Además los ácidos teicoicos tienen un rol en la virulencia de estos microorganismos, porque actúan como antígenos de superficie que se unen a receptores específicos en las células del huésped (Pírez M, 2006).

La superficie externa del peptidoglicano de las bacterias grampositivas está generalmente cubierta de proteínas. Los diferentes grupos de bacterias grampositivas y las diferentes especies difieren en la composición de sus proteínas y de ácidos teicoicos; esto es útil para la clasificación serológica y la identificación bacteriana (Pírez M, 2006).

3.8.2 Estructura de la pared celular de las bacterias gram negativas

Si observamos la pared de las bacterias gram negativas al microscopio electrónico podemos observar tres zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico que incluye una fina capa de peptidoglicano y la membrana externa. Esta última, exclusiva de las bacterias gramnegativas, es una bicapa lipídica que difiere de otras membranas por su capa externa, que está constituida por una molécula anfipática: el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. Además del LPS, la membrana externa contiene fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano.

El LPS está constituido por tres partes: el lípido A, el polisacárido central o del core y la cadena lateral O. La región del lípido A está inmersa en la membrana externa y el resto de la molécula del LPS sobresale de la superficie celular. El core o polisacárido central está unido al lípido A. La cadena O u antígeno O, consiste en unidades repetidas de una subunidad tetrasacárida y es muy variable en su composición entre las diferentes familias, especies y aún dentro de la misma especie de bacterias gramnegativas (Pírez M, 2006).

Las bacterias Gram negativas, como es el caso de *Escherichia coli* y del resto de coliformes, presentan en la superficie de su membrana externa lipopolisacáridos (LPS). Los lipopolisacáridos de las diferentes especies Gram negativas tienen en general la misma composición química, la cual constan principalmente de dos partes unidas covalentemente: Por un lado, tenemos un heteropolisacárido denominado núcleo, el cual está constituido por entre 11 y 14 sacáridos; La parte lipídica la forma un glucolípido el Lípido A, el cual es una endotoxina que consiste en cinco o seis ácidos grasos unidos al fosfato de diglucosamina. Algunos microorganismos, además, presentan una cadena polisacárida de longitud variable denominada Polisacárido específico O o Antígeno O (Mutharia, 1984).

Dicho antígeno es muy variable, incluso dentro de una misma especie bacteriana se pueden encontrar múltiples formas del antígeno O. No obstante, pese a la

especificidad de los anticuerpos por un antígeno en especial, pueden darse uniones inespecíficas con otras bacterias. Hay estudios que indican que este fenómeno en bacterias gram negativas puede ser debido a la similitud antigénica del lípido A entre las especies bacterianas gram negativas (Mutharia, 1984)

IV. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO

El huevo es un alimento con alto nivel nutritivo .Su alta concentración de nutrientes y bajo aporte calórico ponen en alto su papel no sólo en la dieta de la población sino también, y especialmente, en la de algunos grupos con necesidades alimenticias específicas, como ancianos, adolescentes, gestantes, personas que realizan dietas hipocalóricas y vegetarianos (Carbajal, 2006).

Los compuestos que lo conforman cumplen con funciones importantes para la salud. El huevo se compone de tres partes: la cascara, la clara y la yema. La cascara es la primera barrera de defensa que posee el huevo y esta revestida por una película protectora natural (avicultura, 2018). Esta barrera de defensa se puede contaminar al presentarse penetración de contaminantes fecales, especialmente cuando dicha estructura está fisurada o demasiado sucia (López J, *et al.*,1991), o bien porque el tracto reproductor del ave se encuentra infectado (Humphrey, *et al.*,1991). La producción de huevos contaminados es la consecuencia, epidemiológicamente hablando, más importante de las infecciones de SE (*Salmonella enteritidis*) en gallinas ponedoras (Mancera, *et al.*, 2005).

En el 2017 Mexico se coloco en el primer lugar como consumidor de huevo fresco,por esta razon se debe cuidar la produccion y manejo de los sistemas que producen huevo.

En región del centro- occidente del estado de Veracruz existen tres sistemas de producción de huevo, el tipo orgánico que es cuando tienen su nido establecido en un determinado lugar, con un corral donde pueden desplazarse con una alimentación orgánica es decir sin que en su cultivo allá existido un tipo de pesticida . La de traspatio es cuando las tienen al aire libre, la gallina puede poner sus huevos donde sea y comer cualquier cosa que encuentre. Por ultimo tenemos la industrial todo el trabajo es automatizado. Se evaluara la presencia de microorganismos patógenos de los tres sistemas de producción para determinar la carga microbiana de cada uno de ellos y así mismo identificar el tipo de microorganismos que se encuentran presentes en estos sistemas, esto nos servirá para conocer el estado de cada sistema de producción.

V. HIPOTESIS

El huevo de traspatio producido sin buenas practicas pecuarias y sin un manejo adecuado en la alimentación de las aves, puede presentar una elevada carga microbiana incluyendo bacterias patógenas.

VI. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la carga microbiológica en huevo de traspatio, orgánico e industrial de la región centro-occidente del estado de Veracruz.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Detectar diversos microorganismos en la producción de huevo de traspatio, orgánico e industrial mediante la técnica de Gram para la diferenciación de bacterias (Gram positivas y Gram negativas).
- Detectar la posible presencia de *Salmonella spp.* de acuerdo a la norma NOM-114-SSA1-1994.
- Determinar por cuanta viable la carga microbiológica de cada sistema de producción de huevo.
- Evaluar si la presencia de defectos físicos en huevo orgánico, industrial y de traspatio puede correlacionarse con la presencia de *Salmonella spp* u otras bacterias.

VII. MATERIALES Y METODOS

Se inició la fase experimental con la recolección de huevos tipo orgánico, industrial y de traspatio que se producen o se comercializan en la región centro- occidente del estado de Veracruz. La recolección de huevos se realizó en los distintos puntos de la zona, por ejemplo: traspatio se recolectaron en Atlanca, Tenexcalco, Tehuipango, Acatepec (Municipio Huatusco), Chalchiltepec (Municipio Huatusco), Coauixtlauac (Zongolica), Mercado de Potrerillo (Orizaba). Mientras que el huevo tipo orgánico se encontró en el súper mercado llamado Costco, las marcas que se compraron fueron Veggetatarian (Jalisco), Huevo orgánico certificado (Finca Guayacán) certificado por bio-agricet Anexo 1, el mercado más próximo que se tiene a esta región se localiza en Xalapa, otros huevos tipo orgánicos se obtuvieron en la Finca Chilcuahutla (Tomatlán) y en la cabecera municipal de Huatusco. El huevo industrial se compró en la tienda conocida como Aurrera en el Municipio de Coscomatepec, ver.

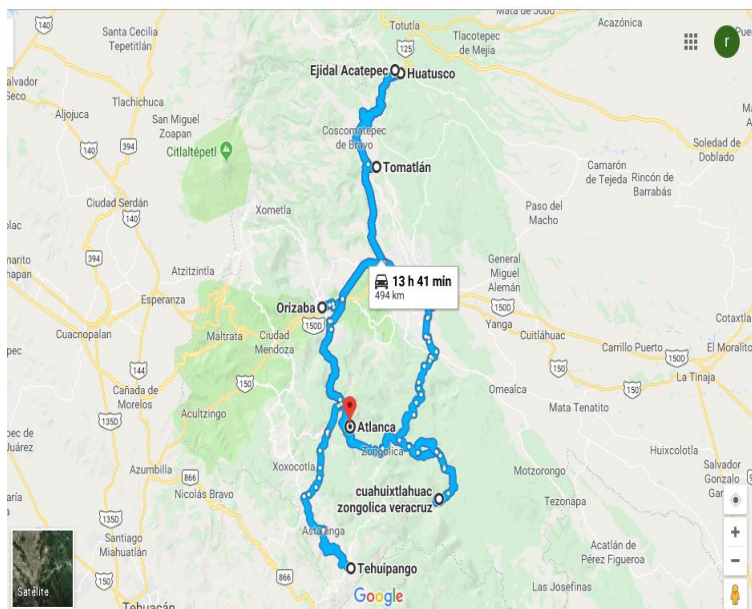


Figura 3: Puntos de recolección de huevo

Fuente: Google Maps

De cada punto de colecta se analizó un lote de 12 huevos, a partir de éste, se obtuvieron 3 muestras por lote, cada muestra contenía 4 huevos. El análisis que se elaboró al huevo comprendió dos etapas que iniciaron con la medición de variables externas (cascara) posteriormente se midieron variables internas (clara y yema). Se pretende conocer la existencia de *salmonella spp* en la cascara, clara y yema para esto se utilizó el procedimiento de la Norma NOM-114-SSA1-1994. Método para la determinación de *Salmonella spp* en alimentos.

7.1 Análisis físicos

Como parte de los análisis fisicoquímicos, se procedió a pesar cada huevo con una balanza analítica (Electronic Balance Analítica Mod.20002).Posteriormente se midieron los diámetros de cada huevo, diámetro mayor (diámetro polar) y diámetro menor (diámetro ecuatorial) para esto se utilizó un vernier (Truper), estos datos sirven para conocer el tamaño del huevo.

Con los datos de los diámetros del huevo se aplicó una ecuación para determinar el volumen y la superficie de cada huevo según la metodología de Narushin (2005) Las variables respuestas fueron: peso del huevo, diámetro mayor (DMa), diámetro menor (DMe).

Las medidas del DMa y DMe se utilizaron para determinar el coeficiente para el volumen teórico (Kv) y coeficiente para la superficie (Ks), según la metodología de Narushin (2005) con las expresiones:

$$Kv = 0,6057 - 0,0018 * (DMe)$$

$$Ks = 3,155 - 0,0136 * (DMa) + 0,0115*(DMe)$$

Los cálculos ya realizados previamente con las ecuaciones anteriores arrojaron resultados que se utilizaron para obtener el volumen teórico (Vt) y la superficie (S) con apoyo de las siguientes expresiones:

$$Vt = Kv * (DMa) * (DMe)^2$$

$$S = Ks * (DMa) * (DMe)$$

7.1.1 Ovoscopia

La técnica que se utiliza para observar el estado de los huevos es la ovoscopia esta técnica consiste en mantener en contra luz el huevo para estudiarlo en una habitación oscura o una caja oscura.

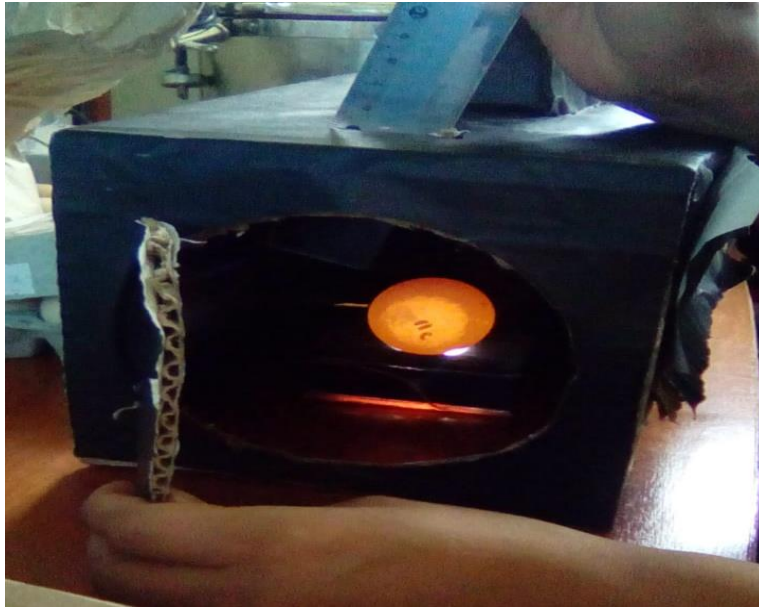


Figura 4. Ovoscopio

Fuente: Elaboración propia

Con la presente técnica se procedió a observar el estado interior de cada huevo obteniendo datos correspondientes:

1. Cámara de aire: Con la cámara de aire podemos conocer la frescura del huevo si la cámara de aire es más grande su frescura es menor y viceversa.
2. La variable de la cámara de aire se midió colocando una regla por la parte superior izquierda, con la cual se obtuvo el diámetro de la cámara de aire para conocer su tamaño.
3. Posición de la yema: se obtuvo con la observación de la posición de esta, por medio del ovoscopio que permite visualizar la parte interna del huevo sin llegar a la destrucción del huevo.
4. Fracturas: Se observó a simple vista las fracturas con mayor tamaño y grosor, por medio del ovoscopio se visualizó las de menor grosor colocando

el huevo en contra luz y se girándolo al mismo tiempo para buscar posibles fracturas.

7.2 Determinación de la carga microbiológica para cascara clara y yema de huevo.

El análisis microbiológico de las muestras de huevo, se realizó de acuerdo a la NOM 114-SSA1 -1994, en la cual se considera como unidad analítica 25.0 g muestra, en una proporción de 1:9 de muestra/caldo. Esta cantidad puede variarse siempre que se mantenga la misma proporción de 1:9 en el medio de pre-enriquecimiento. Para esta fase experimental, todo el trabajo se realiza dentro una cámara de flujo laminar (Industria Figursa Mod.CFH-90). Todo el material fue previamente esterilizado en el autoclave (Mod. SM360-A19 para evitar contaminaciones cruzadas.

- Para realizar la técnica se preparó caldo lactosado como medio de preenriquecimiento de la bacterias, para lograr una condición fisiológica estable de las células de *Salmonella spp.* presentes en las muestras.
1. Para el preenriquecimiento de la cascara en caldo lactosado se utilizaron bolsas estériles, colocando en cada bolsa 4 huevos sin romperlos y vertiendo la cantidad de 36ml de caldo lactosado, manteniendo la misma proporción 1:9 en este caso fue (4:36) de muestra/caldo.
 2. Los huevos permanecieron 5 minutos en la bolsa promoviendo así que las impurezas de la cascara quedaran en el caldo lactosado.
 3. Se procedió a dejar a incubación (Incubadora Memmert Mod.30-1060) por 24 horas a una temperatura de 37°C.

4. Pasando 24 horas de incubación se observaron las muestras para detectar el posible crecimiento de bacterias.

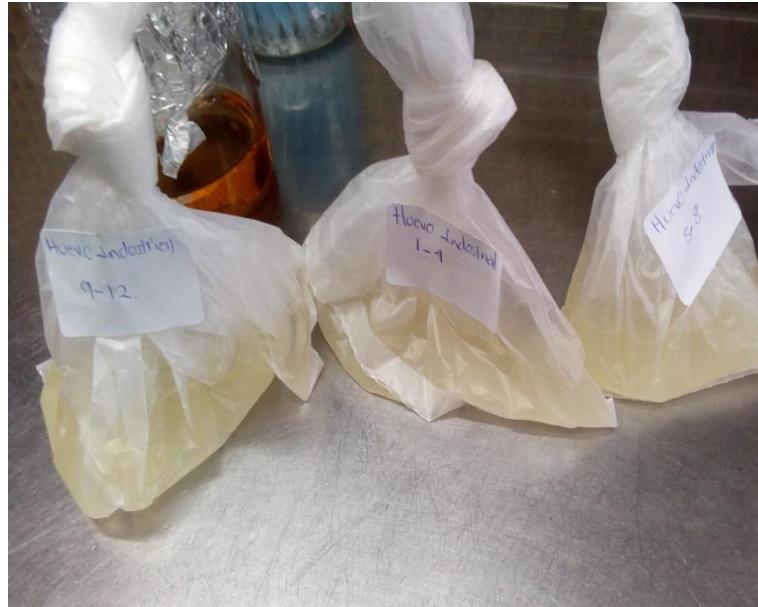


Figura 5. Preenriquecimiento del cascaron

Fuente: Elaboración propia

7.2.1 Análisis de la clara y yema

Para este paso se utilizó un lote de 12 huevos en el cual se manipularon 4 huevos en cada muestra. Las muestras que se obtuvieron fueron 3 por lote, a los tubos se les designaron los siguientes números 1-4, 5-8 y 9-12, la denominación designada fue de acuerdo a el número de huevo que contenía cada muestra.

1. En un vaso de precipitado se rompieron 4 huevos y se homogenizaron perfectamente.
2. Se ocupó una muestra de 15 ml, para hacer un análisis proporcional donde se tomó 135 ml de caldo lactosado, esta proporción quedo 15:135 muestra/caldo.

3. Para esta fase se utilizaron matraces de 150ml previamente esterilizados.
4. Sembrada la muestra en el caldo lactosado se procedió a incubar por 24 horas a una temperatura de 37°C.
5. Pasando 24 horas de incubación (Incubadora Memmert Mod.30-1060) se observó el posible crecimiento de bacterias.



Figura 6: Preenriquecimiento para clara y yema
Fuente: Elaboración propia

7.3 Fundamentos de la Tinción de Gram

Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo (López-Jácome *et al.*, 2014).

Hay bacterias de un mismo género que pueden observarse en la misma muestra como Gram positivas y como Gram negativas, a este evento se le llama tinción Gram variable secundaria (Beveridge, 1990).

Cuadro 3. Composición de la pared celular de Gram positivas y Gram negativas

<i>Bacterias Gram positivas</i>	<i>Bacterias Gram negativas</i>
Glucopéptidos 0.02 a 0.06 μm Proteínas	Glucopéptido 0.01 μm Proteínas Membrana externa:
Acidos lipoteicoicos	Lipoproteínas
Acidos teicoicos Lipopolisacáridos Acidos teicurónicos Fosfolípidos Polisacáridos	Lipopolisacáridos Fosfolípidos Proteínas Polisacáridos

Fuente: Morfología y estructura bacteriana. Temas de bacteriología y virología médica, 2016

El peptidoglicano no se tiñe por sí mismo, más bien parece actuar como barrera de permeabilidad para evitar la pérdida de cristal violeta. Durante el proceso de coloración las bacterias se tiñen primero con cristal violeta y luego se tratan con yoduro para favorecer la retención del colorante.

En la decoloración con etanol, se cree que el alcohol contrae los poros de la capa gruesa de peptidoglicano y se retiene el complejo colorante yoduro; así las bacterias adquieren color violeta. Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las bacterias gramnegativas es muy fina, con menos enlaces y con poros de mayor tamaño. Además, es posible que el tratamiento con alcohol extraiga suficientes lípidos de la membrana externa como para aumentar su porosidad. Por estos motivos el alcohol elimina más fácilmente el complejo cristal violeta yoduro en las bacterias gramnegativas. (Pírez M, 2006).

METODO

La técnica de la tinción de Gram se realizó para analizar cada bolsa previamente incubada, Se tomaron muestras por triplicado de cada bolsa de las cuales se les realizo la tinción de Gram, para diferenciar las bacterias presentes y saber si corresponden a *Salmonella spp* tomando en cuenta que es una bacteria gran negativa con forma cocoide. Anexo 2.

7.4. Enriquecimiento selectivo para cascaron clara y yema

1. Transcurriendo las 24 horas de incubación del análisis de la cascara, clara y yema en medio lactosado, esto como pre-enriquecimiento, se procedió a un enriquecimiento selectivo.
2. Se preparó el medio selectivo selenito cistina el cual no se esteriliza para su uso (Este medio selenito cistina es específicamente para el crecimiento de *Salmonella spp*) se utiliza para incrementar las poblaciones de *Salmonella spp* e inhibir a otros microorganismos.
3. Después se tomaron 9 ml de medio selectivo (selenito cistina) por muestra y se le agrego a cada tubo de ensayo.
4. Posteriormente de cada bolsa se tomó una muestra de 1 ml con un micro pipeta.
5. Se vertió en tubos de ensayo que contenían 9 ml del medio de selenito cistina.

6. Se cerró perfectamente la rosca de los tubos, sellándolos con cinta para evitar que la sustancia se derramara y se etiqueto cada tubo. Se agito para homogenizar adecuadamente la muestra al medio selectivo.
7. Después los tubos son puestos a incubar a 37°C por 24 horas.



Figura 7: Comparación de tubos en distintas fases, Testigo, Pre enriquecimiento y Enriquecimiento selectivo.

Fuente: Elaboración propia

Terminando el estudio microbiológico en la cascara se procede a la destrucción de esta, ya realizado se mide el grosor de la misma y se repite el mismo procedimiento con la clara y yema.

7.4.1 Tubos múltiples para cascara, clara y yema.

1. Para realizar este método se elaboró un buffer de fosfato Anexo 3 de acuerdo a la norma NMX-F-286-1992 para la dilución de muestras, el cual se esterilizo a 120°C y se dejó enfriar.

2. Para las diluciones se necesitaron 3 tubos de ensayo. A estos 3 tubos de ensayo se les agrega 9 ml de buffer de fosfato.
3. A cada tubo con 9 ml de búfer de fosfato se le agrega una alícuota de 1000 μ l (1ml) de la muestra incubada anteriormente con selenito cistina. Se tapa y se sella para evitar que la muestra se vacíe. Se agita suavemente para homogeneizar la muestra
4. Posteriormente se repitió el mismo paso con el tubo ya homogenizado, tomando una alícuota de 1000 μ (1ml) del tubo y vertiéndola en un nuevo tubo de ensayo que contiene 9 ml de buffer de fosfato, se prepararon diluciones de 0.1, 0.01 y 0.001.
5. Estas diluciones se colocaron a incubar a 37°C / 24 horas. Posteriormente se determinó la densidad óptica (DO) de cada suspensión a una longitud de onda de 620 nm.

El tubo blanco que se utilizó para medir en el espectrofotómetro la longitud de onda fue el buffer de fosfato, las mediciones se tomaron cada hora haciendo un total de 4 lecturas.



Figura 8. Diluciones.

Fuente: Elaboración propia

7.4.2 Vertido en placa

1. Se elaboró el medio solido (agar verde brillante) en cual sirve para determinar el número de colonias que crecen en cada placa. y se procede a esterilizar
2. Ya esterilizado el medio y las cajas Petri, se colocan en la campana de flujo (Industria Figursa Mod. CFH-90) laminar para evitar contaminaciones cruzadas.
3. Se esperó que el medio llegara a una temperatura de 45°C para verterlo en las placas
4. El medio se vertió en cajas Petri cada una con 20 ml de medio sólido. Se dejó reposar por 10 minutos hasta que se solidificó el medio.

5. A las muestras con selenito se les realizó una dilución de 0.1 ml en tubos con buffer de fosfatos. Esta dilución sirve para tener una mejor concentración de la muestra y tener colonias que se puedan cuantificar.
6. Ya solidificado el agar bilis verde brillante se tomó una alícuota de 10µl de la muestra ya diluida y se vertió en una caja Petri.
7. Sembrado ya la alícuota, se selló la caja Petri para evitar que la muestra se derramara y se movió en forma circular para que la muestra se homogenizara por todo el medio sólido. Se procedió a incubar a 37 °C por 24 horas.
8. Si después de 24 horas de incubación no hubo crecimiento se espera otras 24 horas según la NOM-210-SSA1-2014.
9. Después del crecimiento de las bacterias en placa se contó las colonias que crecieron, posteriormente se realizó un cálculo para el recuento en placa, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{ufc}{ml} = \frac{\text{numero de colonias en placa}}{\text{factor de dilucion} \times \text{volumen de siembra}}$$

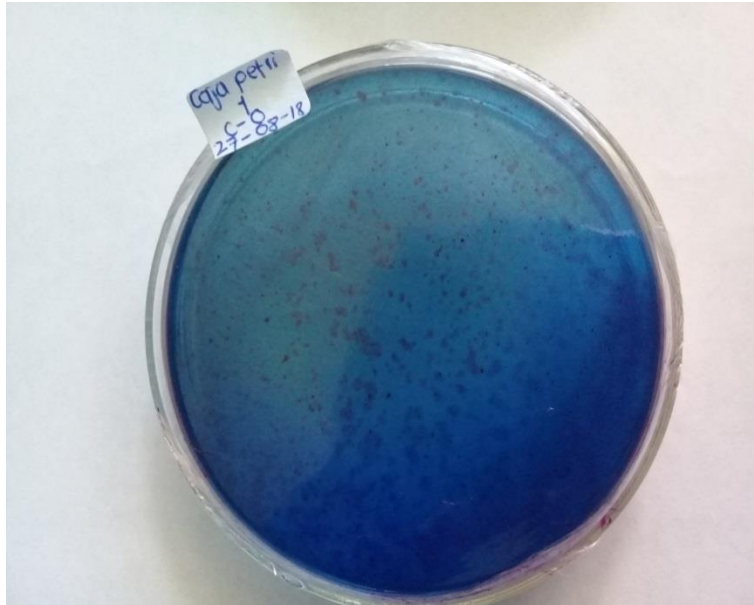


Figura 9: Placa incubada por 24 horas

Fuente: Elaboración propia

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Análisis físicos de huevo tipo orgánico, industrial y de traspatio

En este trabajo de investigación, al total de lote de huevos se les tomaron mediciones físicas, las medidas obtenidas fueron utilizadas para determinar volumen y superficie, con ayuda de la ecuación menciona en el apartado 7.1 según la metodología de Narushin,(2005).

Los análisis físicos de peso, grosor de la cascara y fracturas se describen en el capítulo VII de materiales y métodos.

Los resultados del análisis de varianza no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en los parámetros de volumen, superficie y peso. En el volumen de los tres tipos de huevos son estadísticamente similares pero en el huevo de traspatio existe una notable variabilidad en la desviación estándar, esto mismo sucede en el parámetro de la superficie. Cuadro 4.

En los datos del peso los tipos de huevos no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

El grosor de la cascara en los tres tipos de sistemas de producción de huevo mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$). Los huevos de traspatio

presentaron un mayor grosor de la cascara, mientras que los huevos orgánicos manifestaron un menor grosor, los que presentaron un valor intermedio fueron los industriales.

Cuadro. 4. Comparación de los parámetros físicos del huevo industrial, orgánico y de traspatio

TIPO DE HUEVO	PARAMETROS FISICOS			
	VOLUMEN (ml)	SUPERFICIE (cm ²)	PESO (g)	GROSOR DE LA CASCARA (cm)
Industrial	65.77±3.78 a	78.71±3.20 a	59.938±3.647 a	0.440±0.034 ab
Orgánico	61.31±7.27 a	74.73±6.30 a	56.23 ±5.845 a	0.416±0.058 b
Traspatio	69.87±58.64 a	84.04±57.0 a	58.36±4.683 a	0.45±0.085 a

* Medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los resultados que se observan de volumen, superficie y peso en el cuadro 4, no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

En un estudio realizado por Hernández-Bautista *et al.*, (2013) se evaluó las propiedades de parámetros físicos de los huevos de 4 líneas de gallinas híbridas de las cuales 40 fueron alojadas en jaulas individuales en donde se les proporcionó alimento y 80 fueron criadas a pastoreo completamente, se observó en estos dos sistemas un comportamiento similar en los parámetros de peso del huevo, diámetro del huevo esto se puede deber a la edad de la gallina.

Con esto se explica los datos que se obtuvieron en el análisis de varianza y la variabilidad que se observa en los huevos de traspatio al no conocer con exactitud la edad de la gallina.

El estudio antes mencionado también señala que los huevos de gallinas en pastoreo mostraron mejor grosor de cascara posiblemente por la menor tasa de postura de las gallinas en pastoreo favorece el aumento del grosor de cascarón.

En el análisis de varianza con respecto al grosor de la cascara del huevo tipo orgánico refleja un menor grosor de la cascara de acuerdo con Muriuri y Harrison (1991). La elevada temperatura ambiental aumenta la temperatura corporal de la gallina reduciendo la calidad de la cascara (grosor de la cascara). Según Roland (1977) en los Estados Unidos no se recolecta el total de huevo producido esto por problemas de cascara (cascara delgada y con fracturas) principalmente en los estados del sur. Los huevos tipo orgánicos que se manipularon en la fase experimental son de granjas ecológicas de México ubicadas en el norte del país con un clima cálido que reduce la calidad del cascaron lo que produce un menor grosor del mismo.

De acuerdo con Muriuri y Harrison (1991), la elevada temperatura ambiental reduce la calidad del cascaron, Los huevos tipo orgánicos manipulados para la fase experimental son de granjas ecológicas del norte de México con un clima cálido que reduce la calidad del cascaron lo que produce un menor grosor del mismo.

8.1.1 Ovoscopia en huevo de tres sistemas de producción

La técnica que se utiliza para observar el estado de los huevos es la ovoscopia esta técnica se describe en la sesión 7.1.1 de la metodología antes mencionada.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza en el cuadro 5, no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). La cámara de aire en los tres tipos de sistemas de producción son estadísticamente iguales, solo se observa una notable variabilidad en la desviación estándar en el huevo de traspatio

Cuadro 5. Determinación de la cámara de aire en huevo industrial, tipo orgánico y de traspatio

TIPO DE HUEVO	CAMARA DE AIRE (cm)
Industrial	2.492±0.373 a
Orgánico	2.584±0.719 a
Traspatio	2.474±2.479 a

* Medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

De acuerdo a los datos anteriores no se mostró diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) pero con una amplia variabilidad. La variabilidad observada en el huevo de traspatio, puede deberse o atribuirse a que presentan una menor tasa de postura y por lo tanto, la forma en la cual se recolectan los huevos es diferente en comparación a los huevos industriales Juárez y Ochoa (1995).

Con respecto a las fracturas en la ovoscopia de los huevos industriales y de traspatio no se observaron fracturas mientras que en los huevos tipo orgánicos hubo un porcentaje de 9.37% de fracturas, esto concuerda con los resultados anteriores de la tabla 3. Del grosor de cascara donde se observa un menor grosor al respecto de los otros sistemas de producción del huevo, consecuentemente una mayor fragilidad.

8.2. Análisis microbiológico en cascarón de huevo

Para determinar la carga microbiológica en cascarón de huevo, primero se realizó un preenriquecimiento antes descrito en el apartado 7.2 de la metodología.

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre la carga microbiológica observada en los diferentes tipos de huevo evaluados. Cuadro 6.

Para la dilución 0.1ml se observó que los huevos industriales fueron los que tuvieron la menor carga microbiológica (0.117 unidades de absorbancia), mientras que en los huevos de traspatio y huevos orgánicos se registraron los valores más altos de esta variable (0.421 y 0.368 unidades, respectivamente) (Cuadro 6). Con respecto a la dilución de 0.01 también se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tres tipos de huevo, siendo nuevamente el tipo industrial el que registro el menor valor de carga microbiológica, mientras que los huevos de traspatio mantuvieron la concentración más alta para este tratamiento; en el caso de los huevos tipo orgánico, éstos registraron una carga microbiológica intermedia con relación a los tipos anteriores.

Finalmente, para la dilución a 0.001 los huevos tipo industrial mostraron los valores más altos de carga microbiológica con respecto a los tipos orgánico y de traspatio que se observaron estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 6. Determinación de la carga microbiológica por espectrofotometría DO_{620} para huevos tipo orgánico, industrial y traspatio.

<i>Dilución (ml)</i>	Tipo de Huevo* (Unidades de Absorbancia)		
	Traspatio	Orgánico	Industrial
0.1	0.421±0.148 a	0.368±0.078 a	0.117±0.0155 b
0.01	0.053±0.014 a	0.048±0.010 ab	0.028±0.0051 b
0.001	0.011±0.004 b	0.012±0.006 b	0.038±0.0275 a

* Medias con la misma letra en cada fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

De acuerdo a los resultados anteriores, la menor concentración de microorganismos en huevos tipo industrial puede ser atribuida a las condiciones de higiene con las que se maneja este tipo de sistema de producción, ya que se caracteriza por un control total de la alimentación, sanidad y cuidado de jaulas, así como el manejo de los tiempos y movimientos de las aves para evitar el estrés durante la época de postura (SAGARPA., 2009).

Por otra parte, el manejo y control en la producción de huevo tipo orgánico y traspatio es menos estricto, ya que en ambos casos las parvadas de gallinas son pastoreadas libremente y existe poco control sobre los sitios de postura. De acuerdo con Cuca-García *et al.*, (2011)

8.2.1. Análisis microbiológico en clara y yema de huevo

La determinación de la carga microbiológica de la clara y yema fue de manera similar a la que se describe a la sesión 8.2 iniciando con un preenriquecimiento de la muestra, siguiendo con un enriquecimiento en un medio selectivo como el selenito cistina incubado por 24 horas y consecuentemente la realización de los tubos múltiples para determinar la densidad óptica a una longitud de onda de 620nm.

En el cuadro 7. Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre la carga microbiológica observada en la clara y yema de los diferentes tipos de huevos evaluados. Para la dilución 0.1 el análisis de varianza no mostro diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) entre los tres tipos de huevo, la carga microbiológica del huevo de traspatio y tipo orgánico mostraron gran variabilidad. En la dilución 0.01 se observó resultados estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Finalmente en la dilución 0.001 se mostraron resultados estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$), la carga microbiológica más alta en esta dilución fue el industrial (0.0490 ± 0.034 a) el que presento una menor carga microbiológica fue el orgánico (0.0122 ± 0.005 b) mientras que el de traspatio estuvo en un punto intermedio (0.0168 ± 0.031 ab)

Cuadro 7. Determinación de la carga microbiológica en clara y yema por espectrofotometría DO_{620} para huevos de traspatio, industriales y tipo orgánicos.

Dilución	Tipo de Huevo* (unidades de absorbancia)		
	Traspatio	Orgánico	Industrial
0.1	0.3229 ± 0.283 a	0.2274 ± 0.156 a	0.0626 ± 0.023 a
0.01	0.0416 ± 0.033 a	0.0639 ± 0.090 a	0.0306 ± 0.006 a
0.001	0.0168 ± 0.031 ab	0.0122 ± 0.005 b	0.0490 ± 0.034^a

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Conforme a los resultados discutidos anteriormente; no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) pero se observó en el huevo de traspatio y tipo orgánico existe gran variabilidad en la desviación estándar.

De acuerdo a Mancera (2005) en un estudio realizado en la ciudad de México para identificar *Salmonella enteritidis* en huevo para consumo Se obtuvieron 131 aislamientos considerados en 12 diferentes géneros bacterianos: *Acinetobacter* spp., *Alcaligene* spp., *Bacillus* spp., *Branhamella* spp., *Edwardsiella* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Yersinia* spp, obteniendo una cepa de *Salmonella enteritidis*, la cual se clasificó como no tipificable. Esto explicaría parcialmente los resultados obtenidos en el cuadro 7 donde se observaron cargas microbiológicas similares en las diluciones 0.1ml y

0.01ml de los tres sistemas de producción de huevo, lo cual no significa que el interior de huevo este contaminado con *Salmonella spp* también existen otros tipos de bacterias que no son patógenas o proteínas que no hacen nada pero también arrojan lecturas a una DO₆₂₀.

8.2.2. Comparación de la carga microbiológica en el exterior e interior del huevo

La comparación de carga microbiológica del exterior e interior de huevo tipo orgánico se realizó para observar el comportamiento microbiológico en cada uno de las diluciones (0.1, ml 0.01ml, 0.001ml). Se determinó la densidad óptica por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm. Al respecto los resultados del análisis de varianza no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en la carga microbiológica de la cascara.

En los resultados de la clara y yema los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$), la menor carga microbiología se encontró en la dilución 0.1 (0.2274 ± 0.15 b).

Cuadro 8. Carga microbiológica en el exterior e interior de huevo orgánico por espectrofotometría DO₆₂₀.

	Dilución		
	0.1	0.01	0.001
Cáscara	0.3679 ± 0.07 a	0.0476 ± 0.01 a	0.0117 ± 0.006 a
Clara y Yema	0.2274 ± 0.15 b	0.0639 ± 0.09 a	0.0122 ± 0.005 a

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Lo anterior puede ser atribuido a que las gallinas que se crían en este tipo de producción tienen acceso al exterior. El acceso a pastura, a pesar de no ser específicamente requerido para aves orgánicas, permite a las aves forrajear en busca de plantas, insectos, y generalmente resulta en una mejor salud (Baier, 2015). Las prácticas preventivas y condiciones de vida sanas, como mantener sistemas de alimentación y bebederos limpios, son críticas para reducir enfermedades y presencia de organismos patógenos como *Salmonella* spp y *E. coli*. (Baier, 2015).

Cuadro 9. Carga microbiológica en el exterior e interior de huevo de traspatio por espectrofotometría DO₆₂₀.

	Dilución		
	0.1	0.01	0.001
Cáscara	0.4207±0.14 a	0.0532±0.01 a	0.0115±0.004 a
Clara y Yema	0.3229±0.28 a	0.0416±0.03 a	0.0168±0.031 a

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

La comparación del crecimiento bacteriano del interior y exterior de los huevos de traspatio se realizó partir de las diluciones mostradas en la cuadro 9. Se determinó la densidad óptica por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm.

Los resultados del análisis de varianza no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre la carga microbiológica del interior y exterior del huevo de traspatio y las diluciones correspondientes.

Los datos anteriores pueden ser atribuidos a que en condiciones de traspatio se tiene poco o nulo manejo sanitario, la alimentación de las aves de traspatio consiste en lo que las aves pueden recoger como hojas, hierbas tiernas, forrajes,

insectos, sobrantes de comida, frutas y tortilla los cuales deben ser del día para evitar enfermedades de tipo digestivo (Cuca-García *et al.*, 2011).

Acorde a un estudio realizado en Ecuador en la ciudad de Loja se determinó la presencia de *salmonella spp.* En huevos de gallina de traspasío comercializados en diferentes puntos de esa ciudad, no se evidencio la presencia de *Salmonella spp.* En los análisis microbiológicos de muestras sospechosas, se aplicó el disco de confirmación, siendo su resultado negativas, a pesar de esto el huevo si contiene una carga microbiológica en este estudio ya no se continuo con la genotipificación.

Los resultados que se muestran en la cuadro 9, presentan una carga microbiológica, esto no quiere decir que sea *salmonella spp.* si no que existen otros microorganismos presentes en la muestra, que pueden causar interferencias por ejemplo entre las especies gram negativas y positivas se pueden encontrar múltiples formas de la cadena O u antígeno O es muy variable en su composición entre las diferentes familias, especies y aún dentro de la misma especie de bacterias gramnegativas

No obstante, pese a la especificidad de los anticuerpos (encargados de reconocer el componente de interés) por un antígeno en especial (componente de interés), pueden darse uniones inespecíficas con otras bacterias.

Hay estudios que indican que este fenómeno en bacterias gram negativas puede ser debido a la similitud antigénica del lípido A entre las especies bacterianas gram negativas (Mutharia, 1984)

La carga microbiológica del exterior e interior del huevo industrial se determinó por espectrofotometría, cuya densidad óptica se midió a una longitud de onda de 620 nm. Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en la carga microbiológica de la cascara en la dilución 0.1ml

(0.1170 ± 0.015 a) se mostró la mayor carga microbiológica mientras que en las otras fueron de menor carga y similares.

En el interior del huevo industrial en la clara y yema no se encontraron diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 10. Carga microbiológica en el exterior e interior de huevo industrial por espectrofotometría DO_{620} .

	Dilución		
	0.1	0.01	0.001
Cáscara	0.1170 ± 0.015 a	0.0285 ± 0.005 b	0.0382 ± 0.027 b
Clara y Yema	0.0626 ± 0.023 a	0.0306 ± 0.006 a	0.0489 ± 0.034 a

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

El cuadro 10 de la carga microbiológica del huevo industrial mostro en la cascara diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

En un estudio realizado en la ciudad de México en huevo de consumo (Industrial) De las 400 muestras tomadas de diferentes empresas se obtuvieron 131 aislamientos bacterianos, siendo 88 de yema (67 %), 26 de clara (20 %) y 17 de cascarón con membranas (13 %).

8.3 Comparación del número de colonias presentes en placa por el método de vertido en placa del interior y exterior del huevo.

La presente comparación se obtuvo de la realización de tubos múltiples utilizando únicamente la dilución 0.1 ml esta dilución se realizó para tener una mejor concentración del cultivo, obteniendo colonias aisladas que se puedan cuantificar y ser proporcional al cultivo de inicio, consecuentemente se elaboró un medio de cultivo solido(agar verde brillante) para manipularlo en el proceso de vertido en placa de acuerdo a la norma NOM-114-SSA1-1994, este agar verde brillante permite cuantificar las colonias presentes en el cultivo. Todo el procedimiento se manipulo en la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones cruzadas.

Los resultados presentados en la tabla 10, no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). Los tres tipos de huevos presentan un número de colonias estadísticamente iguales, pero una desviación estándar con una amplia variabilidad en las dos variables internas y externas (cascara, clara y yema) en los huevos de traspatio.

Cuadro 11. Determinación del Número de colonias presentes en cada sistema de producción.

	Tipo de huevo		
	Tipo orgánico	Traspatio	Industrial
Cascara	96.28±85.79 a	112.09±85.09 a	18.33±9.46 a
Yema y clara	105.96±64.06 a	114.00±105.82 a	22.50±23.85 a

* Medias con la misma letra por fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). Los tres tipos de huevos presentan un número de colonias estadísticamente iguales. Acerca de los huevos industriales se encontraron trabajos sobre el tipo de microorganismos presentes en el interior y exterior (cascara, clara y yema) mientras que en los tipo orgánicos no se localizó algún

trabajo sobre microorganismos presentes en ellos, solo de sus propiedades físicas y sensoriales.

En un estudio realizado por Neira Solís (2016) Acerca de la microbiota en huevos y derivados: identificación y desarrollo, en este trabajo se estudió dos sistemas de producción el traspatio y el industrial. Los huevos comerciales mostraron gran variabilidad en la microbiota de la cascara, siendo mayor en los huevos de traspatio que en los industriales, en ninguno de los casos se encontró un género de salmonella spp, respecto al transporte a través de la cascara se observó que los microorganismos tienden a adherirse a la superficie del huevo pudiendo atravesar con relativa facilidad las barreras protectoras naturales y multiplicándose así en el interior del huevo, en la yema los microorganismos encuentran un medio líquido en donde se multiplican fácilmente, por esta razón en la clara y yema existe un mayor número de colonias que en el cascarón

8.3.1 Comparación del número de colonias por vertido en placa en diferentes puntos de colecta

La presente comparación de números de colonias en huevo orgánico de diferentes puntos de colecta se obtuvo de la dilución 0.1 ml esta dilución se realizó para tener una menor y mejor concentración del cultivo, posteriormente se realizó un medio de cultivo sólido para analizar las muestras por cuenta viable (técnica de vertido en placa) de acuerdo a la norma NOM-114-SSA1-1994, el agar verde brillante (medio sólido) permite cuantificar las colonias presentes en el cultivo.

Todo el análisis se realizó bajo campana de flujo laminar para evitar contaminaciones cruzadas. Esta comparación se realizó para identificar el punto de colecta que mayor riesgo de contaminación tiene.

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias estadísticamente significativas en la cascara del huevo, el mayor valor del número de colonias se presentó en la Finca de Chilcuahutla (202.50 ± 3.54 a) y el menor en la Finca de Guayacán (10b). Con respecto a Clara y yema el análisis de varianza no mostro diferencias estadísticamente significativas pero con una notable variabilidad en la Finca de Chilcuahutla (125 ± 141.42 a).

Cuadro 12. Comparación del número de colonias de tipo orgánico en los diferentes puntos de colecta.

VARIABLES	PUNTOS DE COLECTA			
	FINCA CHILCUAHUTLA	JALISCO	HUATUSCO	FINCA GUAYACAN
CASCARA	202.50 ± 3.54 a	186 ± 91.5 a	$48.38 \pm 27.9b$	10 b
CLARA Y YEMA	125 ± 141.42 a	124.4 ± 50.43 a	105.0 ± 67.64 a	78.75 ± 49.8 a

* Medias con la misma letra por fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

En el sistema tipo orgánico de la variable de la cascara existe variabilidad entre los puntos de colecta pues se tiene un valor alto y un valor muy bajo, la Finca de Guayacán tiene una certificación orgánica proporcionada por bio-agricert Anexo1.al igual que la de Jalisco por la certificación de Gallina libre de jaula. La Finca Chilcuahutla tiene certificación de Rainforest y Amsa Starbooks a pesar de esto tiene un elevado número de colonias.

En los huevos de traspatio existió gran variabilidad en los diferentes puntos de colecta. En el caso de la cascara no mostro diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). Los datos son estadísticamente iguales el punto de colecta de Atlanca presento un mayor número de colonias (238.50 ± 54.45 a) pero a su vez los diversos puntos presentaron desviaciones estándar muy altos.

En el caso de la clara y yema los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$). El que tuvo el mayor número de colonias fue Tehuipango (242.50 ± 10.61 a), los que indicaron un menor número de colonias fueron Mercado de Potrerillo (10 bc) y Chalchiltepec (20.00 ± 7.07 c).

Cuadro 13. Comparación del número de colonias de huevo de traspatio en los distintos puntos de colecta.

Variables	Puntos de colecta (Numero de colonias)						
	Atlanca	Tenexcalco	Tehuipango	Mercado de potrerillo	Coauixtla hua	Chalchiltepec	Acatepec
Cascara	238.50 ± 54.45 a	187.50 ± 17.68 a	112.17 ± 99.41 a	99.00 a	83.33 ± 80.36 a	56.25 ± 58.3 4 a	47.83 ± 48.18 a
Clara y yema			242.50 ± 10.61 a	10.00 bc	212.50 ± 88.39 ab	20.00 ± 7.07 c	60.00 ± 39.6 9 bc

* Medias con la misma letra por fila no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos en la tabla 13 muestran puntos de colecta con número de colonias demasiado altos y otros bastante bajos o nulos, esta variabilidad se presentó en la clara y yema de los diferentes puntos de colecta, esto se le puede atribuir al cuidado que cada lugar le da a las aves incluyendo la alimentación y los sitios de postura.

IX. CONCLUSIONES

Los tres sistemas de producción de huevo que se compararon manifestaron parámetros físicos estadísticamente iguales tal es el caso del volumen, superficie y peso. Solo el parámetro del grosor de la cascara fue diferente, el que presento un menor grosor de la cascara fue el huevo tipo orgánico.

En el análisis microbiológico de la cascara de estos sistemas de producción de huevo, se observó una menor carga microbiológica en los huevos industriales, mientras que en los huevos de traspatio y tipo orgánico las cargas microbiológicas fueron similares. Los huevos de traspatio presentaron gran variabilidad en la desviación estándar.

En el caso del análisis microbiológico de la clara y yema de los tres sistemas de producción, no se mostraron diferencias estadísticamente significativas. Los tres sistemas de producción indicaron semejanzas en la carga microbiana. Los huevos tipo orgánicos y de traspatio registraron una amplia variabilidad en la desviación estándar, esto sucedió porque tenían valores demasiados dispersos con respecto a la media, comprendían valores bastante bajos y muy altos.

En la comparación del número de colonias presentes en placa por el método de vertido en placa del interior y exterior (cascara, clara y yema) del huevo los resultados que se observaron en los sistemas de producción fueron estadísticamente iguales, con una variabilidad notable en huevo de Traspatio y

Orgánico esto se atribuye a que en algunos puntos de colecta no se encontró colonias, en otras se localizaron valores bajos mientras unas tenían valores muy altos. La clara y yema en los diferentes sistemas de producción presentaron un mayor valor de la carga microbiana que la cascara, la yema es un medio rico de nutrientes en donde los microorganismos se multiplican fácilmente.

Los huevos tipo orgánicos llegan a presentar una baja carga microbiana, las aves son cuidadas para que los huevos tengan una menor carga o no exista carga microbiana, existen normas para cuidar este tipo de sistema pero no todas las granjas ecológicas cumplen con estos requisitos, por esta razón se encontraron granjas donde había huevos con alto número de colonias y con un valor bajo o nulo, otro factor que afecta a este tipo de huevo fue las fracturas que se observaron pues pudo atribuir a la presencia de microorganismos.

Algo similar ocurrió con los huevos de Traspatio aunque son valores más altos que los orgánicos, son estadísticamente iguales, ya que presentan variabilidad entre los puntos de colecta. Esto nos sirve para conocer el estado de cada sistema de producción, con esto podemos concluir que el sistema de Traspatio se puede mejorar, para reducir la carga microbiológica ya que en varios puntos de colecta no hubo carga microbiana o fue baja todo depende del cuidado y alimentación de las gallinas. Con lo antes mencionado podemos mejorar el sistema de Traspatio para ayudar a la economía de las familias que dependen de esta práctica.

Hasta ahora, no se había determinado la cantidad de microorganismos presentes en los tipos de huevo que se consumen en el estado de Veracruz, particularmente para los sistemas de producción orgánica y de traspatio.

X. BIBLIOGRAFÍA

- (SIAP)., S. S. (2017). *Estudio de calidad. Huevo, mitos y realidades*. Obtenido de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172489/ESTUDIO-HUEVO-2016.pdf>
- Aguinaldo, C. (21 de Noviembre de 2016). *ehow en español* . Obtenido de http://www.ehowenespanol.com/ovoscopia-info_207152/
- Avicultores, U. N. (2018). *SITUACIÓN DE LA AVICULTURA MEXICANA*. Mexico.
- avicultura, E. d. (2018). *selecciones avícolas*. Obtenido de [seleccionesavicolas.com/avicultura/2015/12/riesgos-de-deterioro-y-contaminacion-del huevo por salmonella](http://seleccionesavicolas.com/avicultura/2015/12/riesgos-de-deterioro-y-contaminacion-del-huevo-por-salmonella)
- Baier, A. (2015). *Hoja de Datos: Producción de Aves Orgánicas para Carne y Huevos*. Estados Unidos: Especialista en Agricultura NCAT.
- Bell, C. y. (2002). Test methods en Salmonella: A practical approach. *Blackwell Science Ltd ed*, Paris, Francia.
- Beveridge, T. J. (1990). Mechanism of Gram variability in select bacteria. *J Bacteriol*, 1609-1620.
- Bioagricert. (2013). *Reglamento de certificación de los productos orgánicos*.
- Bleem. (1991). *The Salmonella enteritidis situation in the United states*. USDA: APHIS: VS: 15. USA.: Animal Health Insight.
- Caffer, M. I. (2006). Evolución de la salmonelosis y brotes hospitalarios por Salmonella. *Asociacion Argentina de zoonosis*, 209-215.

- Camacho-Escobar, M. A.-T.-C.-P.-G. (2006). La avicultura de traspatio en la Costa de Oaxaca, México. *Revista Ciencia y Mar*, 3-11.
- Carbajal, A. A. (2006). Calidad nutricional de los huevos y relación con la salud. *revista de nutricion practica*, 73-76.
- Caston, J. P. (2001). Higiene, inspección y control de huevos de consumo. *universidad de murcia*.
- Chung HK, R. H. (2004). Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J Nutr* , 1887-1893.
- Cuca-García J.M.1, G.-A. D.-P. (2011). Producción y Manejo de Aves Domesticas. *Universidad Autónoma Chapingo*, 237.
- Dabanch, J. P. (2003). ZOONOSIS. *Rev Chil Infect*.
- De Reu K, G. K. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella Enteritidis*. *In J Food Microbiol* 112, 253-260.
- Del Ángel-Coronel, O. A.-R.-R. (2016). Evaluación sensorial, parámetros físicoquímicos y preferencias de consumo de huevo. *Revista de Planeación y Control Microfinanciero*, 21-31.
- Estrada Aguila Juan Pablo, B. A. (2012). *DETERMINACIÓN DE Salmonella spp. EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE LA CIUDAD DE QUITO*. QUITO.
- Everest, P. J. (2001). The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol.* , 316-320.
- Garcia Maynez Fernando Ivan. (2012). *Manejo, producción y comercialización del huevo de plato*. Universidad Autonoma Agraria “ Antonio Narro”.
- Gast R. K, M. B. (2004). Evaluation of culture media for detecting airborne *Salmonella Enteritidis* collected with an electrostatic sampling device from the environment of experimentally infected laying hens. . *Poultry Sci* 83, 1106-1111.
- Gil, Á. (s.f.). *Tratado de nutricion*.
- Gil, A. y. (2010). *Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. . Madrid: TRATADO DE NUTRICION.

- Gutiérrez-Gogco L, M.-V. E.-P. (2000). *Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México*. MEXICO : SALUD PUBLICA DE MEXICO.
- Handelman GJ, N. Z. (1999). Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. . *Am J Clin Nutr* , 247-251.
- Hernández-Bautista Jorge, M. I.-L.-M.-A. (2013). Calidad de huevo de cuatro líneas genéticas de gallinas en clima cálido. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1107-1118.
- Humphrey, T. (1991). *Infección por Salmonella enteritidis en pollos y gallinas de postura*. Mexico: Curso de actualización sobre Salmonella enteritidis y Campylobacter en las aves domésticas.
- IEH. (2009). *El gran libro del huevo*. . España: Editorial Evergráficas.
- Instituto de Estudios del Huevo. (12 de JUNIO de 2004). Obtenido de Seguridad alimentaria en huevos y ovoproductos: http://www.senba.es/recursos/pdf/seguridad_alimentaria_huevos_ovoproductos.pdf
- Juárez, A. y. (1995). Rasgos de producción de huevo y calidad de cáscara en gallinas criollas de cuello desnudo, en climatropical. . *Archivos de Zootecnia.*, 79-84.
- Juárez-Caratachea, A. E.-V.-C.-R. (2010). CALIDAD DEL HUEVO DE GALLINAS CRIOLLAS CRIADAS EN TRASPATIO EN MICHOACAN, MEXICO. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 109 - 115.
- Kaiser M, L. S. (2001). Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after Salmonella enterica serovar Enteritidis exposure. *Poultry Sci* 80, 1105-1108.
- Khan, S. S. (2009). The survivability of Bacillus anthracis (Sterne strain) in processed liquid eggs. *Food microbiology* 26, 123-27 .
- López J, K. E. (1991). *Penetración de Salmonella enteritidis en huevos clasificados intactos, sin llegar al contenido*. Mexico: Curso de Actualización sobre Salmonella enteritidis y Campylobacter en las aves domésticas.

- López-Jácome Luis Esaú, *. M.-D.-C. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología Silvestre Ortega-Peña,* Guillermo Cerón-González,* Rafael Franco-Cendejas. *Investigacion en discapacidad*, 10-18.
- Mancera Martínez Arturo, J. V. (2005). Identificación de Salmonella Enteritidis en huevo para consumo en la ciudad de México. *Técnica Pecuaria en México*, 229-237.
- McGee, H. (2007). *La cocina y los alimentos*. España: Editorial Debate.
- Méndez, I., Badillo, C., Ortíz, G., & Faccini, A. (2011). Caracterización microbiológica de Salmonella en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá. *Médicas UIS*, 24:26-33.
- Millward. (2004). *Macronutrient intakes as determinants of dietary protein and amino acid adequacy*. Journal of Nutrition.
- Minorl., L. A. (1984). *SEROLOGY OF SALMONELLA*. LONDON: BERGMAN.
- Muriuri, H. K. (1991). Effect of peripheral foot cooling on metabolic rate and thermoregulation on fed and fasted chicken hens in a hot environment. *Poultry Sci.*, 74-79.
- Musgrove M.T, N. J. (2008). Enterobacteriaceae and related organisms isolated from shell eggs collected during commercial processing. *. Poultry Sci.* 87, 1211-1218.
- Mussaret B. Zaidi, *. C. (2006). Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Latinoam Microbiol*, 121-125.
- Mutharia, L. C. (1984). Monoclonal Antibodies Specific for Escherichia coli J5 Lipopolysaccharide: Cross-Reaction with Other Gram-Negative Bacterial Species. *. American Society for Microbiology, Infection and Immunity* , 631-636.
- Narushin, V. (2005). Production, Modeling, and Education Egg Geometry Calculation using the Measurements of Length and Breadth. *Poultry Science*, 482-489.
- Natoli S, M. T. (2007). Unscrambling the research: Eggs, serum cholesterol and coronary heart disease. *Nutrition and Dietetics* .

- Neira Solis, C. (2016). *MICROBIOTA EN HUEVOS Y DERIVADOS: IDENTIFICACION Y DESARROLLO*. OVIEDO, ESPAÑA.
- organizacion mundial de la salud, O. (septiembre de 2017). Obtenido de www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/
- Oteiza F.J. (1997). *Apuntes para la Historia de la Avicultura en México*. Subsecretaria de Agricultura.
- Pineda, F. A. (2012). *ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DEL HUEVO*. MEXICO: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO.
- Pérez M, M. M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA*, 23-42.
- Procuraduría Federal del Consumidor, P. (03 de octubre de 2017). *Huevo, popular y versátil*. Obtenido de <https://www.gob.mx/profeco/documentos/huevo-popular-y-versatil?state=published>
- Quintín Olascoaga, J. (1983). Dietética. Bromatología de los alimentos industrializados. *Editor C. 4a. edición*, 95-110.
- Qureshi AI, S. F. (2007). Regular egg consumption does not increase the risk of stroke and cardiovascular diseases. *Medical Science Monitor*.
- Ramirez, M. d., & Rodríguez, &. Y. (2013). *Detección de enterobacterias en huevos procedentes de 5 granjas avícolas en occidente de Nicaragua*. LEON-NICARAGUA.
- Rincon, D. P. (2011). Transmisión de Salmonella enterica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, vol. 43, núm. 2,, 167-177.
- Rodríguez Schuller Fernando, P. A. (2010). *Modelo de Producción y Comercialización de Huevos Free Range*. Region metropolitana: Serie Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario.
- Roland, D. (1977). The extent of uncollected eggs due to inadequate shell. *Poultry Sci.*, 1517-1521.
- SAGARPA, S. (1ª Edición, 2009). Manual de Buenas Prácticas Pecuarias Producción de Huevo para Plato. *Subdirección de Promoción y Regulación de Inocuidad Pecuaria*.

- salud, o. m. (septiembre de 2017). Obtenido de www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/
- Sanchez, M. J. (2013). *DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE ENTEROBACTERIAS DELGÉNERO Salmonella spp. EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA DE EMPRESAS AVÍCOLAS DE LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA*. QUITO.
- Sanchez, S. F. (3 de Octubre de 2017). *Expansión*. Obtenido de <https://expansion.mx/empresas/2017/10/13/mexico-es-el-mayor-consumidor-de-huevo-a-nivel-mundial>
- Simopoulos, A. S. (1992). Egg yolk as a source of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant feeding. *American Journal of Clinical Nutrition* .
- Suárez, M. y. (2000). Presencia de Salmonella serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública . *Iatreia*, 13,238-245.
- Torre, M. M. (2012). *El huevo mitos, realidades y beneficios..* Mexico: Ed. Trillas. México, D. F.
- Union Nacional de Avicultores, U. (2018). *Situacion de la avicultura Mexicana*. Obtenido de <http://www.una.org.mx/index.php/panorama/situacion-de-la-avicultura-mexicana>
- Valdespino-Gómez, J. M.-G.-C.-Á. (1994). Epidemiology and etiology of infectious diarrheas.The case of Mexico. *Rev. Latinoam. Microbiol*, 307-324.
- Vásquez D.M.A. (1994). *La cría de gallinas en Oaxaca en el siglo XVI. En: La gallina criolla en los Valles Centrales de Oaxaca*. Nazareno Xocotlán, Oaxaca.: Reportes de Investigación 1. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca.
- Vollmer, G. J. (1999). *huevos, leche y quesos*. Elementos de Bromatología descriptiva.

XI. ANEXOS

ANEXO 1.Certificacion Orgánica

	
CERTIFICADO ORGÁNICO	
Certificado No: 00188/2017 Revisión No: 00	
HERIBERTO IGNACIO ORTIZ SAAVEDRA	
Representante Legal: HERIBERTO IGNACIO ORTIZ SAAVEDRA	
Sede Legal: DEL TECOLOTE # 20, COLONIA CENTRO, TICUMAN, MORELOS, MEXICO. C.P. 62773.	
Sede Operativa: CARR. SAN LUIS-GUADALUPE VICTORIA KM. 4.9, GUADALUPE VICTORIA, PUEBLA, MÉXICO/ TECOLOTE # 20 COLONIA CENTRO, TICUMAN, TLALTIZAPAN, MORELOS, MÉXICO.	
Código de control: ID SENASICA-OCO-16-005-001743	
Tipo de actividad: PRODUCCION VEGETAL Y ANIMAL DE LA ESPECIE AVES DE CORRAL, PROCESAMIENTO Y COMERCIALIZACION DE PRODUCTOS ORGANICOS DE LAS ACTIVIDADES AGROPECUARIAS.	
Producto: MAÍZ, TRIGO, GARBANZO, AMARANTO Y HUEVO	
(Ver página 2/2)	
Por medio del presente documento, y con fundamento en lo dispuesto en los artículos 17, 19, 22 y 23 de la Ley de Productos Orgánicos; 12, 15, 17 y 27 del Reglamento de la Ley Productos Orgánicos; Agricert certifica que el Operador, productos y actividades antes mencionadas, cumplen con las disposiciones y procedimientos señalados en el Acuerdo por el que se establecen los Lineamientos para la Operación Orgánica de las Actividades Agropecuarias. Es responsabilidad total del Operador cumplir permanentemente con las disposiciones y procedimientos correspondientes. Este certificado no es válido como garantía para transacciones. Para cada transacción comercial de producto Orgánico que ampara este certificado, Agricert emite un Documento de Control/Transacción en el que se especifica la cantidad de producto a comercializar. El presente Certificado Orgánico tiene validez de <u>un</u> año a partir de la fecha de emisión. Este certificado es válido únicamente si la copia original y su anexo están presentes.	
	Lugar y fecha de emisión URUAPAN, MICHOACÁN 27/06/2017 Vigencia 25/06/2018
	 V. MANUEL RODRIGUEZ LUENGO Director
	Pág. 1 de 2
Agricert México SA de CV Paseo de la Revolución 330, Colonia Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán, México C.P. 60180. SENASICA-OCO-16-005 Tel. 01 452 5020203 www.agricert.mx info@agricert.mx Organismo de certificación	

CERTIFICADO ORGÁNICO

Anexo I Certificado No: 00188/2017

Revisión No: 00

HERIBERTO IGNACIO ORTIZ SAAVEDRA

Representante Legal: HERIBERTO IGNACIO ORTIZ SAAVEDRA

Sede Legal: DEL TECOLOTE # 20, COLONIA CENTRO, TICUMAN, MORELOS, MEXICO. C.P. 62773.

Sede Operativa: CARR. SAN LUIS-GUADALUPE VICTORIA KM. 4.9, GUADALUPE VICTORIA, PUEBLA, MÉXICO/ TECOLOTE # 20 COLONIA CENTRO, TICUMAN, TLALTIZAPAN, MORELOS, MÉXICO.

Código de control: **ID SENASICA-OCO-16-005-001255**

Tipo de actividad: PRODUCCION VEGETAL Y ANIMAL DE LA ESPECIE AVES DE CORRAL, PROCESAMIENTO Y COMERCIALIZACION DE PRODUCTOS ORGANICOS DE LAS ACTIVIDADES AGROPECUARIAS.

Producto	Categoría	Superficie (Ha)	Nombre del predio	Cantidad Prevista Anual (kg)
PASTO	100% ORGANICO	01-50-00	FINCA GUAYACAN	4, 190,400 Pzas. De huevo (251,424 Kg)
PASTO	100% ORGANICO	49-49-20	RANCHO PARAISO	4, 190,400 Pzas.
INFRAESTRUCTURA		00-50-80		
GALLINAS		60,000 Cbzas.		
MAIZ	100% ORGANICO	100-00-00	PREDIO	1, 000,000
TRIGO	100% ORGANICO	100-00-00	MEXCAHUATLAN	1, 000,000
GARBANZO	100% ORGANICO	50-00-00		400,000
AMARANTO	100% ORGANICO	50-00-00		200,000

Lugar y fecha de emisión

URUAPAN, MICHOACÁN 27/06/2017



Vigencia



ANEXO 2. Tinción de gram

Material y reactivos

- ❖ Mecheros bunsen.
- ❖ Portaobjetos.
- ❖ Placas de Petri o tubos de ensaye con bacterias sembradas sobre un medio de cultivo.
- ❖ Asa de siembra de platino.
- ❖ Goteros
- ❖ Agua destilada.
- ❖ Lugol.
- ❖ Alcohol/Acetona 1:1
- ❖ Safranina.
- ❖ Cristal Violeta.
- ❖ Microscopio óptico.

1. Se tomó con una Asa de siembra la muestra de los tubos de ensayo incubados por 24 horas.
2. Se hizo un frotis en un porta objetos y se distribuye perfectamente.
3. Secar la muestra en un mechero o al aire libre, Teniendo ya seca la muestra.
4. Agregar una gota de azul de metileno y se deja reposar por 1 minuto.
5. Enjuagar con agua destilada hasta eliminar el color.
6. Agregar lugol hasta cubrir la muestra y dejar reposar por 1 minuto.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Agregar una gota de alcohol y reposar de 8 a 10 segundos.
9. Enjuagar con agua destilada.
10. Colocar una gota de safranina y dejar reposar por 45 segundos. para que las bacterias negativas se tiñan de color rojo o rosa.
11. Enjuagar con agua destilada y se deja secar con el aire.

12. Se observa en el microscopio

ANEXO 3. Preparación del buffer de fosfato



Tampón de fosfato, pH 7.2

El tampón de fosfato, pH 7.2 se utiliza para la preparación de blancos de dilución microbiológica en un entorno de laboratorio. El tampón de fosfato, pH 7.2 no está diseñado para usarse en el diagnóstico de enfermedades u otras afecciones en humanos.

La fórmula para el tampón de fosfato está especificada por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) para su uso en la dilución de muestras de prueba. El tampón de fosfato, pH 7.2 se especifica para su uso en diluir agua, productos lácteos y alimentos para métodos microbiológicos. En el examen de agua y productos lácteos se recomienda la adición de cloruro de magnesio.

Este tampón también se conoce como diluyente de fosfato tamponado de Butterfield y se recomienda para el examen de alimentos. El tampón fosfato, pH 7.2, estabiliza el pH del agua utilizada para las diluciones.

Fórmula	Litro
---------	-------

Dihidrógeno fosfato de potasio	26.22 g
--------------------------------	---------

Carbonato de sodio	7.78 g
--------------------	--------

* PH final: 7.2 $\pm$ 0.2 a 25 ° C La fórmula se puede ajustar y / o complementar según sea necesario para cumplir con las especificaciones de rendimiento.

Suplemento

Cloruro de magnesio, 5 ml