

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“MICROBIOTA EN HUEVOS Y  
DERIVADOS:  
IDENTIFICACIÓN Y DESARROLLO”**

**TRABAJO FIN DE MASTER  
POR**

**Carmen Neira Solís**

**Julio, 2016**





**Master en Biotecnología Alimentaria**  
**Universidad de Oviedo**  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



### **PROFESORES TUTORES:**

Dr. D. Mario Díaz Fernández (Universidad de Oviedo)

Dra. Dña. Amanda Laca Pérez (Universidad de Oviedo)

### **CERTIFICA:**

Que Dña. **Carmen Neira Solís** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Oviedo, a 12 de Julio de 2016

Mario Díaz

Amanda Laca

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## Agradecimientos

A mi tutor, el Doctor Mario Díaz, por brindarme la oportunidad de desarrollar el presente proyecto en la unidad de Tecnología Alimentaria junto al grupo de Tecnología de Bioprocesos y Reactores.

A mi tutora, la Doctora Amanda Laca, por su paciencia y ayuda durante todos estos meses de proyecto.

A la Doctora Adriana Laca, por su implicación en este proyecto colaborando como una tutora más en todo momento.

Al Doctor y coordinador del máster, Manuel Rendueles por su orientación y ayuda durante la realización del Máster.

A Cristina, por haberme ayudado a encauzar mis primeras horas en el laboratorio y responder a mis dudas.

A Ana y a la Doctora Paula Oulego, por su ayuda y disponibilidad a lo largo del proyecto.

A mis compañeras de trabajo, en especial a Raquel, por haber hecho posible en muchas ocasiones que estuviese en dos sitios a la vez.

A mis padres, a mi tía, a Nacho y a Marta, por haber hecho posible la realización del Máster y prestarme todo su apoyo durante la realización del mismo.

# Indice

Resumen .....	I
Abstract.....	II
Lista de Figuras .....	III
Lista de tablas .....	V
Lista de abreviaturas .....	VI
Introducción.....	1
2. Fundamentos teóricos .....	4
2.1 El Sector Avícola .....	4
2.1.1 Aves ponedoras en España.....	4
2.1.2 La Industria de Ovoproductos .....	7
2.2 El huevo .....	8
2.2.1 Formación del huevo.....	9
2.2.2 Estructura y composición .....	11
2.2.3 Aspectos nutricionales del huevo.....	15
2.2.4 Presencia de microorganismos en el huevo.....	16
2.2.5 Industria alimentaria y riesgos microbiológicos .....	18
2.3 Técnicas de control en microbiología.....	25
2.3.1 Cultivo en placa.....	25
2.3.2 Microscopía.....	26
2.3.3 Técnicas moleculares .....	27
3. Materiales y métodos.....	30
3.1 Caracterización de la microbiota nativa por técnicas moleculares .....	30
3.1.1 Extracción de ADN .....	30
3.1.2 Amplificación del ADN .....	31

3.-Electroforesis de los amplicones (productos de PCR).....	33
3.1.3 Secuenciación masiva del gen ARNr 16S mediante el sistema Ion PGM™ System .....	34
1. Preparación de librerías .....	35
2. Amplificación por PCR en emulsión o PCRe .....	35
3. Secuenciación masiva por Ion PGM™ System.....	36
3.2 Microorganismo, medios y condiciones de cultivo .....	38
3.2.1 <i>Staphylococcus warneri</i> .....	38
3.2.2 Medios y condiciones de cultivo .....	39
3.2.3 Experimentos de transporte de microorganismos .....	42
3.2.4 Cuantificación de microorganismos.....	44
3.2.5 SEM.....	45
4. Resultados y discusión .....	46
4.1 Caracterización de la microbiota nativa presente en huevos comerciales .....	46
4.2 Comportamiento de patógenos en huevos y ovoproductos .....	52
4.2.1 Transporte de microorganismos a través de la cáscara .....	52
4.2.2 Desarrollo de <i>S. warneri</i> en distintos sustratos.....	60
4.2.2.1 Medio sintético.....	60
4.2.2.2 Ovoproductos líquidos. ....	61
4.2.2.3 Ovoproductos sólidos.....	66
5. Conclusiones.....	67
6. Bibliografía.....	68

## Resumen

El huevo es un alimento ampliamente consumido en el mundo. Se encuentra protegido de la contaminación exterior por la barrera física que le proporcionan la cáscara y las membranas testáceas, así como por la cutícula. Además, muchos de los componentes del huevo presentan ciertas propiedades antimicrobianas. A pesar de estos factores naturales de protección, aproximadamente el 40% de los brotes de intoxicación alimentaria notificados al año en España están relacionados con el consumo de huevos y productos derivados, resultando por tanto, uno de los sectores de estudio más importante para la prevención de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos.

El objetivo de este trabajo ha sido contribuir a ampliar el conocimiento sobre la microbiota presente en huevos y su comportamiento. Así, en primer lugar se realizó la caracterización de la microbiota nativa presente en diferentes tipos de huevos comerciales. Se analizó también el transporte de los microorganismos a través de la cáscara y se caracterizó el desarrollo de microorganismos en ovoproductos. Para ello, se han empleado técnicas moleculares, así como técnicas de cultivo en placa y microscópicas. Se ha empleado como microorganismo modelo *Staphylococcus warneri*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los huevos comerciales mostraron una gran variedad de microbiota en la cáscara, siendo destacable que esta biodiversidad fue mayor en huevos camperos que en huevos procedentes de gallinas enjauladas. Por otra parte, es destacable el hecho de que no se haya encontrado *Salmonella* en ninguna de las muestras estudiadas. Respecto al transporte a través de la cáscara, se observó que los microorganismos tienden a adherirse a la superficie del huevo, pudiendo atravesar con relativa facilidad las barreras protectoras naturales presentes en el mismo y multiplicándose así en el interior del huevo. En cuanto al crecimiento de microorganismos en ovoproductos, el cultivo de la bacteria modelo demostró que la clara líquida tiene cierto efecto antimicrobiano, mientras que en la yema los microorganismos se multiplican rápidamente. Del mismo modo, en ovoproductos sólidos cocinados *S. warneri* se aclimató fácilmente al medio, multiplicándose y manteniendo su concentración constante a lo largo del tiempo.

# Abstract

The hen egg is widely consumed worldwide. It is protected from the outside contamination by physical barriers, the eggshell and its membranes and the cuticle. Additionally, many of egg compounds show different antimicrobial properties. Despite of these natural protection factors, almost the 40% of the outbreaks notified in Spain are related to egg and its derivative products consumption. Hence, this is one of the most important sectors to study regarding the prevention of foodborne diseases.

The aim of this work has been to contribute to broad the knowledge about egg microbiota and its behaviour. So, first the native microbiota present in different kind of commercial eggs was characterised. In addition, the transport of microorganisms through the eggshell and also their growth in egg derivatives were evaluated. Molecular techniques, microbiological cultures and microscopy techniques have been employed. *Staphylococcus warneri* has been used as model microorganism

Results showed that commercial eggs presented a great variety of microorganisms. It should be noted that this biodiversity was higher in case of eggs coming from loose hens compared to caged hen eggs. Furthermore it is remarkable that *Salmonella* was not found in any of the studied samples. Regarding the transport of microorganisms through the eggshell, it was observed that microorganism trend is to stick on eggshell surface. These microorganisms were able to go through the natural egg barriers and additionally they grow inside the egg. The culture of model bacteria showed that albumen possessed antimicrobial effects, whereas microorganisms quickly multiply in yolk. *S. warneri* easily acclimated to solid cooked egg foodstuff, growing and keeping its concentration constant along the time.

## Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de la formación del huevo en la gallina.....	10
Figura 2. Componentes estructurales del huevo. Adaptado de Li-Chan y Kim (2008).	11
Figura 3. Componentes de la yema. ....	15
Figura 4. Ejemplo de marcadores o barcodes.....	35
Figura 5. Esquema de la unión biotina-receptor.....	36
Figura 6. Secuenciador Ion Torrent.....	37
Figura 7. Fotografía del microchip.....	37
Figura 8. Esquema del microchip.....	37
Figura 9. Matrices con los dos medios de huevo líquido.....	40
Figura 10. Fotografía de las tortillas de patata simuladas .....	42
Figura 11. A la izquierda, fragmentos de cáscara inoculados con 2µL de medio. A la derecha, proceso de quitarle las membranas testáceas al huevo.....	43
Figura 12. A la izquierda, huevos en medio inoculado. A la derecha, huevos en medio estéril. ....	44
Figura 13. Diagrama de la microbiota presente en huevos procedentes de gallinas enjauladas .....	46
Figura 14. Diagrama de la microbiota presente en huevos procedentes de gallinas camperas .....	47
Figura 15. Vista en detalle del género <i>Staphylococcus</i> en huevos camperos.....	50
Figura 16. Vista en detalle del género <i>Staphylococcus</i> en huevos procedentes de gallinas enjauladas. ....	50
Figura 18. Detalle de la microestructura de la cáscara de huevo (x5000) (escala: 5 µm) .....	52
Figura 17. Microfotografía de cáscara de huevo (x100) (escala: 100 µm).....	52
Figura 19. Imagen SEM cutícula intacta (Samiullah et al.,2013.....	53
Figura 20. Microfotografía de cáscara inoculada con asa de siembra (x30000) (escala: 0.5 µm).....	54
Figura 21. Microfotografía de cáscara inoculada con 2 µL de cultivo líquido de <i>S. warneri</i> (~10 <sup>7</sup> ufc/mL) (x15000) (escala: 1 µm).....	54
Figura 22. Imagen SEM fragmento de cáscara inoculado (x5000) (escala: 5µm) .....	55
Figura 23. Fotografías de un huevo al 2º día (izquierda) y al 16º. ....	56

Figura 24. Interior de la cascara de huevo analizado el 16° día .....	56
Figura 25. Crecimiento en placa del exterior (izquierda) y del interior de la cáscara al 2° día. ....	57
Figura 26. Crecimiento en placa del exterior del huevo a los 16 días.....	58
Figura 27. Crecimiento en placa del interior del huevo a los 16 días.....	58
Figura 28. En parte de arriba: exterior e interior de un huevo inoculado al 2° día. En la parte de abajo: exterior e interior de un huevo inoculado al 16° día. ....	59
Figura 29. Curva de crecimiento en Nutrient Broth. ....	60
Figura 30. Curva de crecimiento en clara de huevo. ....	62
Figura 31. Crecimiento en yema de huevo .....	64

## Lista de tablas

Tabla 1. Censo de ponedoras en la U.E (Millones de aves) (MAGRAMA ,2016) .....	5
Tabla 2. Producción total de huevos (para incubar y para consumo) en la U.E.(Miles de Tm) (MAGRAMA 2016) .....	6
Tabla 3. Contenido del tubo de PCR indicado por el protocolo.....	33
Tabla 4. Ciclos de amplificación de PCR.....	33
Tabla 5. Distribución de géneros en relación a la clase de huevos. ....	48
Tabla 6. Resultados de las medias de los recuentos en placa de las tortillas.....	66

## Lista de abreviaturas

AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
APPCC	Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos
CE	Comunidad Europea
EFSA	European Food Safety Authority
ETA	Enfermedades de Transmisión Alimentaria
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
ICMSF	Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos
IEH	Instituto de Estudios del Huevo
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
NB	Nutrient Broth
NGS	Next Generation Sequencing
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de Bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
SEM	Scanning Electron Microscope
TGS	Third Generation Sequencing
UFC	Unidades Formadoras de colonias

# Introducción

El huevo es un alimento ampliamente consumido a nivel mundial, siendo la producción europea superior a las 6.500.000 toneladas y la mundial superior a las 60.000.000 toneladas (Agrinews, 2016). En España la producción anual supera las 900.000 docenas (dato de 2013), constituyendo un 10.9% de la producción de la Unión Europea (UE) en 2014. En concreto, en ese año se exportaron 186.742 toneladas de huevos (Magrama, 2016). Los últimos datos obtenidos en la Base de Datos de Consumo de Hogares del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente revelan que en este país se consumen más de 500.000 miles de kilogramos de huevos al mes (Magrama, 2016).

Pero el huevo no sólo es un alimento importante desde el punto de vista económico, sino que también lo es desde el punto de vista nutricional y tecnológico. Es el alimento con mayor densidad de nutrientes de entre los que son consumidos habitualmente. Dichos nutrientes, además, están disponibles para ser utilizados por nuestro organismo. El huevo es especialmente rico en aminoácidos esenciales, ácidos grasos, además de minerales y vitaminas necesarias en la dieta. Su alta concentración en nutrientes y su bajo aporte calórico ponen de relieve su papel no sólo en la dieta de la población en general, sino también (y especialmente) en la de algunos grupos con necesidades alimenticias específicas como ancianos, adolescentes, gestantes, personas que realizan dietas hipocalóricas y vegetarianos. Los huevos aportan al total de la dieta una apreciable cantidad de proteína de fácil digestión y un perfil de aminoácidos esenciales similar al que se considera ideal para el hombre. Por esta razón, se dice que es de alto valor biológico (94 en una escala de 100). (IEH, 2016). Por otra parte, el huevo es fuente de otros componentes que hoy se sabe que tienen un importante papel en la salud y en la prevención de algunas de las enfermedades crónicas frecuentes en las sociedades desarrolladas. Se han descrito la presencia de compuestos con diversas bioactividades, antimicrobianas, inmunomoduladoras, antioxidantes, anticancerígenas y antihipertensivas, entre otras (Huopalahti et al., 2007; Kovac-Nolan et al., 2005). De hecho, algunas de estas sustancias ya se aíslan y producen a escala industrial como la lisozima y avidina de la clara o inmunoglobulinas (IgY) y fosfolípidos de la yema.

Desde el punto de vista tecnológico cabe mencionar que la industria ha sabido aprovechar las ventajas que el huevo y sus fracciones más sencillas (la clara y la yema) pueden aportar. Hay una inmensa cantidad de productos en el mercado que contienen al huevo completo o a una de sus partes como pueden ser productos de repostería, productos lácteos, mayonesas, salsas, etc. Aunque no solo la industria alimentaria ha sabido valorar las propiedades nutricionales y tecnológicas que el huevo puede aportar, pues también es empleado en el campo de la microbiología para la producción de medios de cultivo. Algunas propiedades tecnológicas que las partes o algunos componentes del huevo tienen son las de efecto antibacteriano (lisozimas de la clara), emulsionante, lubricante o surfactante (lecitina de la yema), entre otras propiedades (IEH, 2016).

La función fundamental de la estructura del huevo es dar protección durante el desarrollo del embrión que dará lugar al pollito después de la eclosión. Por esta razón, el embrión se encuentra en el huevo protegido de la contaminación exterior mediante barreras físicas, mecánicas y químicas. Las barreras físicas son proporcionadas por la cáscara y las membranas testáceas. La barrera mecánica se debe a la elevada viscosidad que presenta el albumen lo que dificulta el transporte de microorganismos en el interior del huevo y las barreras químicas se basan en diferentes compuestos, tales como la lisozima, presentes en el huevo que poseen propiedades antimicrobianas (IEH, 2016). En concreto, la lisozima es un enzima que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas produciendo la lisis bacteriana (Carrillo, 2013). Sin embargo, a pesar de la existencia de estas barreras naturales frente a la contaminación microbiana y, aunque en la industria avícola se está intentando reducir la incidencia de roturas y deterioro de la cáscara mediante factores genéticos, nutricionales y ambientales, la manipulación de los huevos sigue siendo un foco importante de contaminación bacteriana (Hincke et al., 2008).

De hecho, casi el 40% de los brotes de intoxicación alimentaria notificados en España está relacionado con el consumo de huevos y productos derivados, resultando por tanto, el sector de estudio más importante para la prevención de las Enfermedades Transmitidas por los alimentos (ETA) (OMS, 2016).

El objetivo general de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de la microbiota presente en el huevo y su desarrollo tanto en huevo como en productos derivados. Para ello se han planteado los siguientes objetivos concretos:

- Caracterización de la microbiota nativa presente en la cáscara de huevos comerciales mediante técnicas moleculares.
- Análisis del transporte de patógenos a través de la cáscara de huevo empleando como microorganismo modelo la bacteria *Staphylococcus warneri*.
- Estudio del desarrollo de patógenos en ovoproductos líquidos empleando como microorganismo modelo la bacteria *Staphylococcus warneri*.
- Evaluación del crecimiento de patógenos en ovoproductos sólidos empleando como microorganismo modelo la bacteria *Staphylococcus warneri*.

## **2. Fundamentos teóricos**

### **2.1 El Sector Avícola**

La industria avícola mundial ha cambiado más durante los últimos 50 años que ningún otro sector de la ganadería. El consumo total de carne de ave y huevos ha aumentado considerablemente durante las cinco décadas pasadas y continúa aumentando a medida que crece la población humana. El éxito de la industria avícola global puede atribuirse a diversos factores:

- Innovaciones técnicas y sustitución del trabajo manual.
- Ambiente controlado: temperatura optimizada y programas de iluminación para facilitar la producción a lo largo de todo el año.
- Reducción de la mortalidad e incremento del rendimiento, debido fundamentalmente a la mejora de las condiciones higiénicas de producción.
- Mejor nutrición: formulación de piensos equilibrados adaptados a las necesidades específicas de cada sistema productivo.
- Mejora del potencial genético, tanto en aves productoras de carne como en ponedoras.

Las empresas a todos los niveles de la industria avícola: criadores, reproductores, productores de huevos, etc. han ido, en los últimos años, enfocándose de manera continuada al mercado, compitiendo para conseguir la aceptación de unos consumidores cada vez más críticos y exigentes.

#### **2.1.1 Aves ponedoras en España**

La avicultura de puesta representa en España una actividad ganadera de primer orden, aportando a la renta agraria unas cifras que se incrementan cada año, lo que le configura como un sector firmemente implantado y consolidado en la economía ganadera nacional, suministrando un producto básico para la dieta. También resulta significativa su importancia en el contexto de la Unión Europea, situándose entre los primeros puestos, tanto en producción como en censo (Tablas 1 y 2), siendo su balance comercial claramente exportador.

Tabla 1. Censo de ponedoras en la U.E (Millones de aves) (MAGRAMA ,2016)

PAISES	1986	1992	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014 *	%
Bélgica	9,6	11,9	8,3	6,1	5,6	4,7	3,7	3,0	1,6	2,3	0,7
Bulgaria			3,6	3,8	3,3	3,1	3,2	4,5	2,8	2,7	0,8
R. Checa			8,3	9,5	8,1	8,6	8,3	7,2	7,2	5,8	1,8
Dinamarca	4,0	5,0	2,9	2,9	2,8	2,9	2,3	1,1			0,0
Alemania	38,0	52,5	41,7	42,9	41,0	42,6	41,6	41,9	42,6	38,0	11,5
Estonia			2,1	9,8	11,1	11,1	11,5	1,5	0,8	0,2	0,1
Grecia	5,5	7,8	7,4	8,0	7,3	7,2	7,2	0,8	0,4	0,3	0,1
España **	50,5	44,3	50,5	50,0	50,6	51,1	49,5	43,6	44,7	44,2	13,4
Francia	55,6	55,9	54,6	53,9	46,1	48,6	44,8	41,9	52,9	55,6	16,9
Croacia									1,5	1,4	0,4
Irlanda	1,7	2,3	2,4	2,4	12,0	16,4	12,7	6,4	2,9		0,0
Italia	27,3	41,9	46,7	46,5	43,8	42,6	42,0	42,4	42,6	60,2	18,2
Chipre			0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	1,7	0,5
Letonia			1,6	2,0	2,1	2,6	3,6	1,8	1,7	1,3	0,4
Lituania			2,8	3,2	3,5	2,7	2,1				0,0
Hungría			6,0	4,2	3,6	3,2	3,3	2,0	2,9	2,5	0,8
Malta			0,3	0,5	0,7	0,2	0,2				0,0
Holanda	29,7	38,5	37,4	38,6	35,9	38,7	39,5	36,1	37,4	35,3	10,7
Austria			6,4	6,8	5,5	7,0	7,9	6,7	6,8	6,7	2,0
Polonia			26,2	28,0	26,8	32,4	35,8	31,6	33,2	32,8	9,9
Portugal		7,1	3,1	2,5	3,7	5,7	7,3				0,0
Rumanía			2,0	2,2	3,5	3,9	4,5	4,4	3,9	2,3	0,7
Eslovenia			1,0	1,0	1,0	1,0	1,0				0,0
Eslovaquia			2,4	0,7	3,9	3,6	3,1	2,8	4,0		0,0
Finlandia			3,1	3,2	3,2	3,5	3,3	3,3	3,5	3,5	1,1
Suecia			6,0	5,8	5,8	5,8	5,9	2,3			0,0
R. Unido	35,5	40,9	31,1	31,8	30,8	33,4	33,7	32,6	33,2	33,1	10,0
UE - 12	255,3	308,1									
UE - 27			358,6	367,0	362,5	383,4	378,8	318,7			
UE - 28									327,5	329,9	100,0
España / UE (%)	19,8	14,4	14,1	13,6	14,0	13,3	13,1	13,7	13,6	13,4	

\* Provisional y/o estimación.

\*\* En estas cifras están incluidas tanto las ponedoras selectas de aptitud comercial como las gallinas cuya producción se destina al autoconsumo.

Fuentes: Comisión de la Unión Europea (comunicaciones de los expertos) y estadísticas del MAGRAMA.

Elaboración: S.G. Productos Ganaderos.

**Tabla 2. Producción total de huevos (para incubar y para consumo) en la U.E.(Miles de Tm) (MAGRAMA 2016)**

PAISES	1996	1992	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	%
Bélgica	184	201	194	174	162	154	139	162	163	163	200	2,7
Bulgaria				99	96	97	90	78	70	78	92	1,3
R. Checa			140	148	192	188	188	188	243	73	150	2,0
Dinamarca	81	88	77	78	81	74	76	76	76	78	82	1,1
Alemania	743	902	780	778	782	693	658	777	827	849	865	11,8
Estonia			13	10	9	11	11	11	11	11	10	0,1
Grecia	123	124	113	117	112	109	100	100	100	100	128	1,7
España	675	602	886	896	874	894	903	879	781	805	798	10,9
Francia	909	932	975	952	947	918	954	873	849	993	1.012	13,8
Croacia												0,0
Irlanda	37	37	46	42	41	42	44	44	43	46	45	0,6
Italia	572	665	743	743	748	755	745	723	698	691	820	11,2
Chipre			9	8	9	9	8	8	8	8	8	0,1
Letonia			36	42	41	41	41	41	41	41	42	0,6
Lituania			57	59	55	53	51	51	51	51	59	0,8
Hungría			175	168	169	162	168	156	167	165	152	2,1
Malta			7	7	7	7	5	5	5	5	7	0,1
Holanda	656	630	615	634	644	665	692	710	690	704	729	9,9
Austria			91	95	96	92	95	99	99	99	95	1,3
Polonia			546	556	590	590	637	637	637	637	575	7,8
Portugal	95	103	119	122	124	124	131	128	126	127	127	1,7
Rumania				338	335	311	310	268	301	301	360	4,9
Eslovenia			14	19	22	24	24	22	21	21	20	0,3
Eslovaquia			70	73	73	72	76	76	76	80	71	1,0
Finlandia			57	57	58	53	61	62	62	67	69	0,9
Suecia			100	96	104	104	104	104	104	104	103	1,4
R. Unido	772	639	634	619	646	647	709	703	671	716	731	9,9
UE - 12	4.847	4.923										
UE - 25			6.497									
UE - 27				6.930	7.017	6.889	7.020	6.981	6.920			
UE - 28										7.013	7.350	100,0
España / UE (%)	13,9	12,2	13,6	12,9	12,5	13,0	12,9	12,6	11,3	11,5	10,9	

Fuentes : S.G. Estadística del MAGRAMA  
Grupo de expertos "Estadísticas y previsiones" de los Comités consultivos de la UE

El consumo de huevos de gallina "per cápita" en España es alto (240 huevos por habitante y año), siendo en los últimos años el más elevado de la UE. Regionalmente la mayor producción se centra en las Comunidades Autónomas de Castilla-La Mancha, Castilla y León, Cataluña, Andalucía y Galicia.

Durante los últimos diez años, la producción mundial de huevos ha aumentado un 45% y se prevé que continúe incrementándose durante los próximos veinte años (Magrama, 2016). La producción y el comercio de los derivados del huevo ha progresado rápidamente (IEH, 2016) adquiriendo cada vez un carácter más relevante el papel que ocupa dentro del sector la industria de ovoproductos (confitería, panadería, productos lácteos, charcutería, platos preparados, bebidas, salsas, alimentos infantiles...), a ella va destinada casi la cuarta parte de la producción total. En concreto, la proporción de los huevos destinados a la industria es en Europa del 27% y en España del 15% (Magrama, 2016).

## 2.1.2 La Industria de Ovoproductos

En los años recientes se ha puesto mucho énfasis en el procesado de los huevos y ovoproductos, aunque la industria de ovoproductos aún está lejos de otras industrias como la cárnica o la láctea. La tendencia actual es la mejora de los ovoproductos existentes y el desarrollo de nuevas aplicaciones en la industria, incrementando la vida útil, mejorando la seguridad y el perfil nutricional, así como la calidad sensorial. (Zeidler, 2002).

Un gran número de industrias utilizan el huevo como ingrediente de otros alimentos. Esto se debe, por una parte, a la evolución de la industria alimentaria, que cada vez demanda materias primas y presentaciones comerciales más adecuadas a su proceso productivo evitando las complicaciones de manipular grandes cantidades de huevos frescos y sus residuos.

Los ovoproductos, según la legislación comunitaria, son "los productos transformados resultantes de la transformación de huevos, de diversos componentes o mezclas de huevos, o de la transformación subsiguiente de tales productos transformados." Todos llevan un control de calidad, el más frecuente es el control en las propiedades funcionales (poder espumante en las claras, poder emulsionante en las yemas, capacidad de coagulación, comportamiento en repostería, solubilidad de productos desecados, etc). En cualquier caso, en el control de calidad debe aparecer la inspección de materias primas, ingredientes y embalajes, la inspección de los procesos tecnológicos, el control de las condiciones sanitarias de producción, el examen químico, físico y microbiológico de los productos acabados, el control de los vertidos y la asistencia a los consumidores en materia de uso y manejo de los elaborados (Rendueles, 2016).

### a) *Elaboración de ovoproductos*

La fábrica de ovoproductos es la industria alimentaria que recibe huevos para su transformación y produce los derivados industriales del huevo. Estos pueden ser huevo líquido pasteurizado (entero, clara o yema), huevo cocido, tortillas, huevo en polvo y muchos otros. Los ovoproductos pueden destinarse al consumo humano directo o a industrias alimentarias y no alimentarias para otros procesados.

Para la industria alimentaria y la restauración colectiva, los ovoproductos ofrecen algunas ventajas frente al huevo en cáscara:

- Mayor versatilidad. Se pueden emplear los derivados apropiados para cada fin.
- Fácil empleo y dosificación.
- Evitan los inconvenientes derivados de la manipulación de las cáscaras (más trabajo: cascar y eliminar los residuos).
- Control de la seguridad bacteriológica.
- Manipulación más sencilla: fácil almacenamiento, ahorro de tiempo de preparación y de mano de obra.
- Facilitan la distribución (principalmente en los ovoproductos desecados, con muy poco volumen y peso, más fácil conservación y más duración).

Un adecuado procesamiento lleva a obtener materias primas óptimas para la elaboración posterior de alimentos y genera productos de alta calidad

El ovoproducto que más se utiliza en la hostelería, restauración colectiva y en la industria alimentaria en España es el huevo pasteurizado, que se puede encontrar en el mercado como huevo entero líquido pasteurizado, yema líquida pasteurizada y clara líquida pasteurizada. Pueden ir con sal o azúcar u otros aditivos, según su uso o destino final, a petición del cliente. También es frecuente el uso de huevo cocido pelado y platos preparados y listos para su consumo, como tortillas y revueltos. Para el proceso de pasteurización del huevo, los huevos utilizados deben cascarse una vez que estén limpios y secos. Tras la rotura de la cáscara, se procede al tratamiento térmico, que consiste en mantener el huevo líquido a una temperatura entre 64-65°C durante 2 a 4 minutos, lo que garantiza la eliminación de los microorganismos patógenos que puedan encontrarse en el huevo líquido, principalmente Salmonella, así como el mantenimiento de las características físico-químicas y tecnológicas del producto (Rendueles, 2016).

## 2.2 El huevo

El huevo es un alimento de origen animal con importantes propiedades nutricionales y tecnológicas. Cuando no se cita la especie, suele hacerse referencia al huevo de gallina. Éste se forma a partir de un óvulo de gallina (la yema), que se recubre de material nutritivo y de protección (clara y cáscara) antes de la puesta.

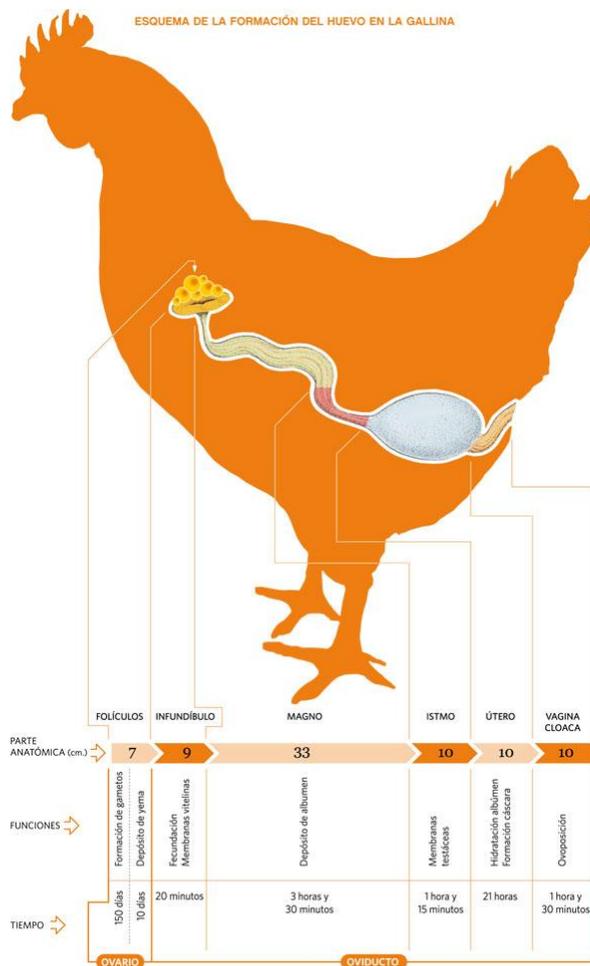
La gallina ovula cada 26 horas aproximadamente, lo que significa que produce casi un huevo al día desde su madurez sexual (alrededor de las 20 semanas de vida). La gallina no necesita estar fecundada para producir huevos, y por ello en las granjas de ponedoras no hay gallos.

### **2.2.1 Formación del huevo**

El proceso de formación es complejo y comprende desde la ovulación hasta la puesta del huevo. Para que el huevo cumpla los requisitos de calidad, los numerosos componentes que lo integran deben ser sintetizados correctamente y deben disponerse en la secuencia, cantidad y orientación adecuada. El éxito de este proceso de formación del huevo se basa en que las gallinas sean alimentadas con nutrientes de alta calidad y mantenidas en situación de confort ambiental y óptimo estado sanitario. En la Figura 1 se muestran las distintas partes del aparato reproductor femenino del ave, indicando su implicación en la formación de la yema, el albumen o clara y la cáscara, y el tiempo necesario para el proceso.

El ovario de la gallina contiene más de 4000 óvulos. De ellos, sólo un reducido número llegará a desarrollarse y constituir una yema. La yema se desarrolla a partir de un óvulo rodeado por una membrana folicular muy vascularizada. La ovulación es el momento en el que la yema de mayor tamaño se libera del ovario, mediante la ruptura de la membrana folicular, y es depositada en el infundíbulo, primera estructura del oviducto.

El oviducto tiene forma de tubo de unos 60 a 70 cm de largo y con cinco secciones: infundíbulo, magno, istmo, útero o glándula cascarógena y cloaca. El infundíbulo es la entrada del oviducto, el lugar donde la yema o vitelo es capturada tras la ovulación. Tiene forma de embudo y la yema lo atraviesa en unos 15-30 minutos. Aquí se forman las dos capas más externas de la membrana vitelina, que representan  $\frac{2}{3}$  partes del total y juegan un papel muy importante en la protección de la yema, evitando la entrada de agua desde la clara. Además, el infundíbulo es el lugar donde se puede producir la posible fertilización del huevo.



**Figura 1. Esquema de la formación del huevo en la gallina.**

El magno es la sección más larga del oviducto y presenta distintos tipos de células que sintetizan las proteínas que se irán depositando durante las 3 horas y 30 minutos que tarda este proceso. El magno, complementariamente con el útero, es responsable de las propiedades fisicoquímicas de la clara y de la situación de la yema. Cuando el huevo sale del magno, el albumen presenta un aspecto gelatinoso denso ya que solo contiene un 50% del agua. El proceso de hidratación y estructuración del albumen acaba en el útero; es decir, su función es determinante en la calidad interna del huevo.

Al llegar al istmo el albumen empieza a rodearse de las dos membranas testáceas. En el útero o glándula cascarógena se produce una rotación del huevo dando lugar a la torsión de las fibras proteicas del albumen denso, formándose las chalazas, que sostienen centrada la yema. Por lo tanto, el útero, complementariamente al magno, es el responsable de las propiedades fisicoquímicas de la clara y de la situación de la yema. El huevo permanece en el útero de 18 a 22 horas y se produce la formación de la cáscara. Una vez formado el huevo se producirá la expulsión a través de la cloaca o vagina (IEH, 2016).

## 2.2.2 Estructura y composición

El huevo de gallina está constituido por tres partes fundamentales: la cáscara, la clara o albumen y la yema, que representan respectivamente en torno al 10%, al 60% y al 30% del peso de un huevo (Li-Chan y Kim, 2008). En la Figura 2 se muestra un esquema de la estructura física del huevo.

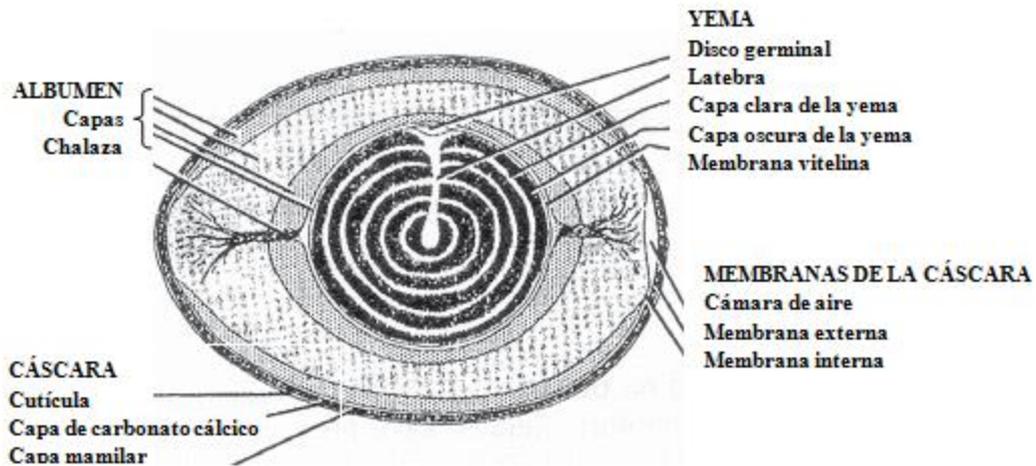


Figura 2. Componentes estructurales del huevo. Adaptado de Li-Chan y Kim (2008).

### 2.2.2.1 Cáscara

La cáscara es la cubierta exterior del huevo y tiene gran importancia, ya que mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. Está constituida por una matriz cálcica formada por una matriz de fibras y esferas proteicas y de mucopolisacáridos, con cristales de calcita en los intersticios. La matriz tiene dos zonas: la inferior, en contacto con las membranas y la superior, cuyas fibras corren paralelas a la superficie de la cáscara. Esta estructura da una gran resistencia a la cáscara.

El color de la cáscara, que puede ser blanco o marrón según la raza de la gallina, depende de la concentración de pigmentos, denominados porfirinas, depositados en la matriz cálcica y no afecta a la calidad, ni a las propiedades nutritivas del huevo. Los diferentes niveles de coloración dependen del estado individual de la gallina. La alimentación o el sistema de cría no influyen en el color de la cáscara y tampoco en su intensidad.

La calidad o resistencia de la cáscara depende principalmente del metabolismo mineral de la gallina y, a su vez, de una adecuada alimentación. Otros factores que influyen sobre la calidad de la cáscara son la genética, el estado sanitario y la temperatura ambiente. El grosor es otro aspecto a destacar, 1/3 de mm es un estándar que garantiza menos del 50% de las roturas en la manipulación.

Entre sus componentes minerales el calcio es el más importante, encontrándose proporciones mucho menores de sodio, magnesio, zinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro. Está compuesta principalmente por carbonato cálcico (94%) y proteínas duras (4%). La cáscara está atravesada por numerosos poros que forman túneles entre los cristales minerales y permiten el intercambio gaseoso (tanto vapor de agua como CO<sub>2</sub>) entre el interior y el exterior. Su número varía entre 7 000 y 15 000 y son especialmente numerosos en la zona del polo ancho del huevo. Está recubierta por la cutícula, que tiene un grosor de 20 micras, y cubre casi todos los poros. La cutícula está formada principalmente por proteínas (90%) y pequeñas cantidades de lípidos y carbohidratos. La principal función de esta película de mucina consiste en cerrar los poros, formando una barrera física contra la penetración de microorganismos. También evita la pérdida de agua y da un aspecto brillante al huevo. Tras la puesta se presenta en forma húmeda, luego se seca y se va deteriorando y, entre los dos y cuatro días desde la puesta, desaparece. Si el huevo se lava o se frota, puede desaparecer antes.

Las membranas que recubren el interior de la cáscara son dos: membrana testácea interna y externa. Ambas rodean el albumen y proporcionan protección contra la penetración bacteriana. Las membranas testáceas se encuentran fuertemente unidas entre sí cuando el huevo es puesto por la gallina. Poco tiempo después de la puesta, debido a la contracción del volumen del contenido del interior del huevo al enfriarse (la temperatura corporal de la gallina es de 39°C, la misma del huevo recién puesto) penetra aire en el polo grueso, por su mayor concentración de poros, y se separan en esta zona las membranas para constituir la cámara de aire. La membrana interna tiene una fina estructura de fibras de queratina entrelazadas y la presencia de lisozima en la matriz albuminosa impide el desarrollo de bacterias gram positivas. La membrana externa es mucho más porosa y sirve como asentamiento para la formación de la cáscara. A medida que el huevo pierde frescura, pierde también agua en forma de vapor a través de los poros de la cáscara y la cámara de aire se expande. Un huevo sometido a altas temperaturas «envejece» antes. La

altura de la cámara de aire es una de las medidas de la frescura de un huevo en términos de calidad, independientemente de los días transcurridos tras la puesta.

La integridad y limpieza de la cáscara son factores que determinan si un huevo es apto o no para su consumo como huevo fresco. Cuando la cáscara está sucia o deteriorada es posible que los microorganismos adheridos a la superficie penetren al interior del huevo. Por esta razón, no pueden comercializarse para consumo humano directo los huevos cuyas cáscaras presenten suciedad, fisuras o roturas (IEH, 2016, Stadelman et al., 1990).

#### **2.2.2.2. Clara o albumen**

En la clara se distinguen dos partes según su densidad: el albumen denso y el fluido. El albumen denso rodea a la yema y es la principal fuente de riboflavina y de proteína del huevo. El albumen fluido es el más próximo a la cáscara. A medida que el huevo pierde frescura, el albumen denso es menos consistente y termina por confundirse con el fluido, quedando finalmente la clara muy líquida y sin apenas consistencia a la vista.

En la clara se encuentran algo más de la mitad de las proteínas del huevo y está exenta de lípidos. Las vitaminas B2 y niacina están en mayor cantidad en la clara que en la yema. La clara es transparente, aunque en ocasiones pueda presentar alguna «nube» blanquecina que no supone ningún problema para su consumo y suele estar relacionada con la frescura del huevo.

La clara o albumen está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (cerca del 12%). La proteína mayoritaria (54% del total proteico) es la ovoalbúmina, seguida de la ovotransferrina (12%) y el ovomucoide (11%), la lisozima también se encuentra en una cantidad importante (3.5%). La ovoalbúmina es una fosfoglicoproteína que durante el almacenamiento se transforma en la sovoalbúmina, una forma más compacta y estable al calor. La conalbúmina u ovotransferrina es una glicoproteína que destaca por su facilidad para unirse a cationes  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . El ovomucoide es también una glicoproteína muy resistente al calor, una de sus propiedades más interesantes es que inhibe la tripsina (IEH, 2016). La lisozima es una proteína de gran importancia ya que es de la clase de enzimas que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias gram-positivas por ruptura del enlace  $\beta(1-4)$  entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG), debilitando así la pared celular y produciéndose de esta manera la lisis bacteriana al entrar el agua en la célula (Carrillo, 2013). La lisozima además tiene

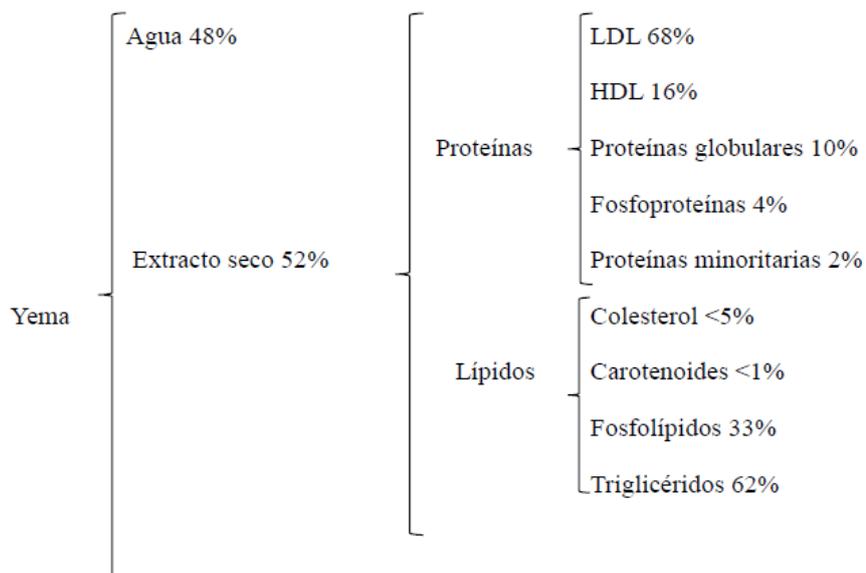
un alto carácter electropositivo y por ello puede igualmente aglutinar a las bacterias, que presentan sin excepciones carga electronegativa (Caso, 2015).

### **2.2.2.3 Yema o vitelo**

La yema es la parte central y anaranjada del huevo. Está rodeada de la membrana vitelina, que da la forma a la yema y permite que esta se mantenga separada de la clara o albumen. En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte más interesante desde un punto de vista nutricional. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50%. Los sólidos se reparten prácticamente de modo equitativo entre proteínas y lípidos, estando presentes en menor proporción vitaminas, minerales y carotenoides. Estos últimos son compuestos de efecto antioxidante y los responsables del color amarillo de la yema, que varía en tono e intensidad en función de la alimentación de la gallina. La yema presenta además propiedades emulsionantes, gelificantes, colorantes, aromatizantes y antioxidante, que pueden variar según sus tratamientos de conservación (calor, congelación, secado, etc.) y las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, etc.). Por estas características, la yema de huevo es ampliamente usada la industria alimentaria, como base de preparación de muchos productos (mayonesa, aderezos de ensaladas, tortas, pasta, cremas, etc.), así como en la farmacéutica, cosmética, biotecnológica y médica, entre otras.

La membrana vitelina que envuelve la yema posee dos capas separadas que le dan resistencia a la estructura. En los huevos frescos las fibras de esta membrana se entrelazan con las chalazas las cuales impiden la movilidad de la yema dentro del albumen. El valor económico de la yema depende de factores como su esfericidad, resistencia de la membrana o color. El tiempo y la humedad van dañando la calidad general del huevo, incluida la de la yema, que se diluye y pierde resistencia en la membrana. Su pH oscila entre 6 (fresco) y 6,4 (al cabo de unas semanas) (Anton et al., 2007).

En la Figura 3 se muestran los principales componentes presentes en la yema de huevo de gallina.



**Figura 3. Componentes de la yema.**

### 2.2.3 Aspectos nutricionales del huevo

Dos huevos aportan unas 141 kilocalorías (kcal), lo que supone un 7% de la energía diaria recomendada para un adulto, que necesita 2000 kcal. El huevo no contiene hidratos de carbono, por lo que la energía procede fundamentalmente de su materia grasa. La calidad de la grasa presente en el huevo es buena pues el contenido de AGM -ácidos grasos monoinsaturados- (36%) y AGP -ácidos grasos poliinsaturados- (1,6%) supera ampliamente al de grasa saturada -AGS- (2,8%). Contiene también AGP Omega-3, como EPA -ácido eicosapentaenoico- y DHA -ácido docosaheptaenoico- que han demostrado efectos beneficiosos sobre la salud.

El huevo es una importante fuente 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%), cinc (20%) y selenio (18,2%). Ello hace del huevo un alimento nutricionalmente denso, rico en componentes nutritivos y con muy pocas calorías.

Muchos de los nutrientes del huevo están presentes de una forma que los hace fácilmente disponibles, es decir, aprovechables para el organismo humano. Para poder aprovechar todas sus ventajas nutricionales, el huevo debe cocinarse hasta que la clara esté coagulada. El calentamiento facilita la digestión completa de las proteínas del albumen, la liberación de algunas vitaminas y minerales y la destrucción de posibles microorganismos contaminantes.

No es recomendable, por razones nutricionales y de seguridad alimentaria, consumir grandes cantidades de huevo crudo. De hecho, éste contiene una sustancia denominada avidina que actúa como antinutriente, puesto que bloquea la absorción de la biotina, pudiendo originar una deficiencia vitamínica que se ha observado en culturistas que tomaban abundante clara cruda para incrementar su masa muscular. El tratamiento térmico habitual en el cocinado del huevo provoca la desnaturalización de la avidina, permitiendo que la biotina quede biodisponible (IEH, 2016).

La yema aporta el 75% de las calorías, la mayoría del hierro, vitamina A, tiamina, vitaminas liposolubles y la mitad de las proteínas, del contenido total del huevo. Así mismo posee la mayoría de los ácidos grasos que el organismo humano no puede sintetizar, conocidos como esenciales. Sin embargo, presenta un alto contenido en colesterol, el cual ha sido asociado a problemas cardiovasculares cuando hay altas ingestas en la dieta diaria, haciendo del huevo un alimento de consumo moderado, a pesar de sus demás bondades.

#### **2.2.4 Presencia de microorganismos en el huevo**

Existe una contaminación de los huevos antes de la puesta, se trata de una contaminación ligada a la presencia de microorganismos, patógenos o no, en el aparato genital de la ponedora. Por ejemplo, una de cada dos ponedoras tiene bacterias no patógenas, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Micrococcus*, en el oviducto y en el ovario. Estas bacterias, se encuentran raramente en el interior de los huevos y juegan un papel muy poco importante en la alteración de los mismos.

Por otro lado, los huevos pueden contaminarse por bacterias procedentes de la alimentación de la gallina, que se transmiten desde la vía digestiva hasta el ovario. Un caso muy común es el de la *Salmonella*, patógena para el ser humano, aunque la transmisión transovárica de estas bacterias al huevo precisa de un nivel muy alto de

contaminación de los alimentos. Gracias a los progresos en las condiciones de cría, alimentación animal y veterinaria, el nivel de infección por *Salmonella* ha disminuido mucho en los últimos años.

Otras bacterias que pueden contaminar los huevos antes de la puesta son *Staphylococcus* sp, *Pasteurella* sp, *Listeria* sp y *Pseudomonas* sp. Sin embargo, dicha contaminación es difícil de determinar, ya que la toma de muestras estériles del interior del huevo es problemática, las técnicas de esterilización de la cáscara no son eficaces y existe riesgo de contaminación ambiental, por ejemplo a partir del aire.

Otro tipo de contaminación del huevo es durante o después de la puesta, se puede decir que el 90% de los huevos se contaminan de esta forma. El número de microorganismos presentes en la cáscara puede variar de algunos cientos a varias decenas de millones, con una media de  $10^5$  ufc/huevo. Esta contaminación externa depende muy estrechamente de las condiciones de higiene durante la producción. Una parte importante procede de las heces del animal, del lugar de la puesta y del polvo del aire. La contaminación durante la puesta se debe a que las aves, el oviducto y el intestino desembocan en un conducto denominado cloaca, por lo que los huevos pueden contaminarse externamente con materia fecal de la propia gallina.

En los huevos aparece principalmente *Micrococcus* sp, que resiste a las condiciones de sequedad que representa la superficie de la cáscara. Otras bacterias encontradas son: *Staphylococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Aeromonas* sp, *Alcaligenes* sp, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Enterobacter* sp, *Proteus* sp y *Flavobacterium* sp. En los huevos pasteurizados y desecados por atomización pueden sobrevivir microorganismos termófilos del género *Bacillus*. Entre los mohos pueden aparecer representantes del género *Mucor* o *Penicillium*, mientras que de levaduras solo aparece miembros del género *Torula*.

La contaminación microbiana de los huevos depende del estado de limpieza de los lugares de puesta y de la manera que son manipulados después de ser obtenidos. Si la cáscara permanece intacta, la única vía de penetración de los microorganismos al interior del huevo son los poros. La clara del huevo es una buena protección contra los microorganismos por su alto coeficiente de viscosidad, y su contenido en lisozima, alto

pH de hasta un 9,5 y su contenido en ovotransferrina (Stadelman et al., 1990; Caso, 2015).

En ambientes húmedos pueden desarrollarse mohos en la superficie, cuyo micelio puede hidrolizar la cutícula, facilitando la penetración de los microorganismos al interior. Es muy importante que el embalaje de los huevos ya que contribuye a eliminar el nivel de humedad, por eso son preferibles los envases de cartón a los de plástico (Caso, 2015).

### **2.2.5 Industria alimentaria y riesgos microbiológicos**

A partir de la segunda mitad del siglo XX el desarrollo económico y las transformaciones socio-culturales han determinado una mayor complejidad de conservación (congelación, almacenamiento y transporte frigorífico, liofilización, envasado aséptico, tratamientos térmicos, uso de conservantes...) que permiten alargar los períodos de conservación de los alimentos, pero no siempre contribuyen a la seguridad alimentaria. Por ejemplo, los alimentos precocinados suponen un mayor riesgo que los productos frescos envasados ya que se han sometido a una mayor diversidad de tratamientos que aumentan la probabilidad de haber sido contaminados (OMS, 2016; FAO, 2016).

Los aspectos que en los últimos años han contribuido a un incremento global de los riesgos asociados a la producción y distribución de alimento son principalmente los sistemas de producción intensivos, que suponen la utilización masiva de plaguicidas y productos similares en agricultura y la generalización de piensos, antibióticos y hormonas de crecimiento en ganadería; la industrialización de procesos de transformación y elaboración de alimentos, que implica la utilización de aditivos químicos; el desarrollo de nuevas fórmulas, como los precocinados; y el mayor consumo de alimentos fuera del hogar, que aumenta el riesgo de intoxicaciones (OMS, 2016; FAO, 2016).

Los alimentos son transmisores potenciales de diversos microorganismos y metabolitos microbianos, algunos de ellos patógenos para el hombre. Según su procedencia habitual es posible agrupar estos microorganismos en endógenos o exógenos. Mientras que los primeros ya están presentes en el interior del alimento, procedentes de las materias primas, los segundos se incorporan al alimento durante su procesado, almacenamiento o transporte, a través de los manipuladores de alimentos, así como del personal encargado y los materiales disponibles en cocinas, locales comerciales o almacenes (Mossel et al., 1985).

La flora exógena de los alimentos está constituida principalmente por microorganismos saprófitos causantes del deterioro de dichos alimentos debido a alteraciones de su composición, apariencia y/o estructura como resultado del metabolismo microbiano, siendo algunos de ellos indicadores de la calidad higiénica de los alimentos. Pero en esta categoría de microorganismos exógenos los que entrañan un mayor riesgo son aquellos que resultan patógenos para el hombre, ya que las enfermedades causadas por éstos constituyen un problema de salud pública, creciente en todo el mundo, que varía con la demografía, la industrialización y centralización de la producción de alimentos, el transporte y comercio, y la evolución y adaptación microbianas en cada zona. A pesar de la naturaleza ubicua de los brotes de estas enfermedades de etiología microbiana transmitidas por los alimentos, relativamente pocos microorganismos han sido reconocidos como riesgos potenciales para la salud (Mossel et al., 1985; Dooley et al. 2000).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos portadores de microorganismos patógenos o sus toxinas en cantidades suficientes para afectar a la salud del consumidor. Los síntomas varían en función del tipo de agente contaminante, así como de la cantidad consumida del alimento contaminado, aunque tienen el denominador común de un cuadro clínico gastroentérico, con ciertas peculiaridades en cada caso, Por ejemplo, *Escherichia coli* O157:H7 puede provocar fallos en el riñón, *Salmonella* sp puede producir artritis e infecciones serias y *Listeria monocytogenes* puede generar meningitis, o incluso abortos en mujeres embarazadas (Mossel et al., 1985). Las enfermedades transmitidas por alimentos pueden manifestarse a través de:

- Infecciones alimentarias. Son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos. Por ejemplo: salmonelosis, hepatitis vírica tipo A y toxoplasmosis.

- Intoxicaciones alimentarias. Son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contiene toxinas, bien presentes de forma natural en tejidos vegetales o animales, o bien productos resultantes del metabolismo microbiano en el alimento. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades incluso cuando el microorganismo es eliminado. Por ejemplo: botulismo, intoxicación por *Staphylococcus aureus* o por toxinas producidas por hongos.

-Toxi-infecciones alimentarias. Se refieren a la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, que además son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos. Por ejemplo, cólera.

#### **2.2.5.1 Seguridad Alimentaria**

El concepto de seguridad alimentaria justifica las buenas prácticas a considerar en la producción, distribución y consumo de alimentos, con el propósito de garantizar la ausencia de riesgos para la salud pública. A consecuencia del creciente interés que han mostrado los organismos públicos, empresas y consumidores por la seguridad de los alimentos, se han ido perfilando paulatinamente los principios básicos que rigen la seguridad alimentaria (Laca et al., 2003).

Desde que en 1962 se tomaron las primeras medidas para establecer un Codex Alimentarius o Código Alimentario, punto de referencia mundial para consumidores, productores, organismos nacionales de control, y el comercio internacional, se ha logrado que el tema de la calidad e inocuidad de los alimentos sea objeto de atención mundial. Un año después, bajo el Programa Conjunto FAO/OMS de normas alimentarias, se estableció la Comisión del Codex Alimentarius para desarrollar normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados, cuyos objetivos son la protección de la salud del consumidor, asegurar prácticas de comercio claras y promocionar la coordinación de las normas alimentarias. (Codex Alimentarius, 2016).

La demanda de alimentos de calidad ha sufrido un especial empuje en los últimos años debido a las difundidas crisis alimentarias que se han producido (vacas “locas”, dioxinas en animales, brotes de *Salmonella*), junto con la sensibilización de los consumidores ante el abuso de antibióticos y hormonas en ganadería, el uso excesivo de plaguicidas en agricultura y la utilización sistemática de aditivos en la industria alimentaria. En la actualidad, se exigen alimentos que sean inocuos para la salud, nutricionalmente adecuados y elaborados mediante prácticas agrícolas, ganaderas e industriales responsables con el medio ambiente (OMS, 2016).

Consecuentemente, y con el objetivo de proteger la salud de los consumidores, se ha desarrollado una nueva legislación en la Unión Europea que afecta a todos los países miembros, al mercado interior y a las importaciones de terceros países. De acuerdo con Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo del Consejo, todas las industrias

alimentarias de la UE están obligadas a aplicar sistemas de control higiénico-sanitarios e implantar el Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC), instrumento que garantiza la inocuidad de los alimentos mediante la identificación de los peligros específicos asociados a cada alimento y la adopción de medidas de control (EFSA, 2016).

Dentro del marco legislativo, las industrias alimentarias se encuentran severamente controladas y restringidas en cuanto a incidencias que puedan provocar enfermedades o lesiones en el consumidor. Estos riesgos o peligros alimentarios se encuentran distribuidos a lo largo de la cadena alimentaria, incluyendo la producción primaria de piensos, el procesado industrial, la distribución de alimentos, la hostelería y el consumo doméstico. Respecto a esto, según su naturaleza se distinguen peligros químicos, físicos y biológicos. (AECOSAN, 2016).

Los riesgos químicos pueden encontrarse de forma natural, como en el caso de las toxinas, o también pueden incorporarse de forma accidental como productos de limpieza y desinfección, metales pesados o productos derivados de las máquinas.

Los riesgos físicos consisten en la presencia de cuerpos extraños en la comida que llegan de forma accidental o por descuido durante el almacenamiento o manipulación del alimento.

Los riesgos biológicos son los producidos por bacterias, hongos, virus o parásitos

#### **2.2.5.2 Riesgos microbiológicos en ovoproductos**

A pesar de las medidas tomadas por la industria alimentaria en general, y la de ovoproductos en particular, con el fin de evitarlos riesgos para la salud pública, de los brotes de intoxicación alimentaria notificados recientemente en España, alrededor del 38% estaba relacionado con el consumo de huevos y derivados. En este sentido, en la regulación EC 2073/20052 sobre criterios microbiológicos relacionados con los alimentos, han sido introducidos criterios de higiene para cinco categorías de alimentos entre los que se encuentran los huevos y ovoproductos. Estos criterios han sido definidos para seis peligros: *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, toxinas estafilocócicas (producidas por *Staphylococcus* sp.), *Cronobacter sakazakii*, *Escherichiacolie* histamina (Hennekinne et al., 2015).

Existen diversos trabajos recientes en los que se estudia la contaminación del huevo por *Salmonella*, centrándose fundamentalmente en las diferentes rutas de entrada de la bacteria en el huevo (Raspoet et al., 2011; Ricke&Gast, 2014), también ha sido descrito el efecto protector de las barreras naturales, tanto físicas como químicas, del huevo frente a la por *Salmonella* (Howard et al., 2012). Incluso algunos autores han estudiado el efecto protector de ciertas barreras adicionales a las naturales del huevo (Leleu et al., 2011). Un 90% de los huevos son estériles en el momento de la puesta, sin embargo, pueden resultar fácilmente contaminados por bacterias procedentes del tracto intestinal de las gallinas, de las heces y del ambiente. Sólo una pequeña parte de las bacterias son potencialmente patógenas, pero, a pesar de las medidas de seguridad, siempre existe el peligro de que las materias primas alimentarias sean contaminadas en algún momento de la cadena de producción (Perry & Yousef, 2012). Aunque, algunos autores han incluido en sus trabajos otros microorganismos además de la *Salmonella*, en general, se ha prestado muy poca atención a otras bacterias responsables de las enfermedades transmitidas por alimentos (De Reu et al., 2006; Chemaly & Salvat, 2011). Asimismo, tampoco han sido publicadas muchas investigaciones acerca de los peligros de intoxicaciones alimentarias provocadas por los ovoproductos y los platos preparados derivados del huevo, ya que la mayor parte de la bibliografía existente se centra en las técnicas de prevención asociadas al del huevo durante el proceso productivo en las explotaciones avícolas, pero no durante su procesado posterior (Gole et al., 2014).

Los Staphylococcaceae son una familia de bacterias gram positivas que incluyen el género Estafilococos (*Staphylococcus*), notable por incluir varios patógenos importantes.

Este género comprende microorganismos que se encuentran de manera ubicua en la naturaleza (están presentes en el aire y en el agua y también en la mucosa y en la piel de los humanos), incluyendo más de 30 especies y varias subespecies. Son bacterias muy resistentes y puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco, y son muy persistentes en alimentos con contenido alto en sales y azúcares. Asimismo, sus toxinas son altamente estables, y resistentes al calor, congelación e irradiación, por lo que una vez formadas en el alimento, resulta extremadamente difícil eliminarlas. En concreto las toxinas pueden producirse y permanecer activas en amplios intervalos de temperatura (10-48 °C), pH (4-9.6) y actividad del agua (0.85-0.99). Las toxinas estafilocócicas se pueden transmitir a las personas a través del consumo de alimentos contaminados por falta de higiene e inadecuadas prácticas de cocinado y conservación. De hecho, las

intoxicaciones alimentarias producidas por las toxinas estafilocócicas constituyen un problema mundial y la ingestión de una dosis de menos de 1 microgramo de toxina en un alimento contaminado produce los síntomas de la enfermedad. *Staphylococcus aureus* es el miembro más virulento de este género y es uno de los contaminantes alimentarios más importantes, ya que es una de las especies productoras de toxinas termorresistentes responsables de intoxicaciones alimentarias. Durante el procesamiento de los alimentos *S. aureus* puede contaminar los alimentos, lo que puede causar la intoxicación de los consumidores (Morente et al., 2016).

Además, en los últimos años, han surgido nuevas circunstancias que hacen aconsejable llevar a cabo estudios de vigilancia de la situación actual de la resistencia a antimicrobianos de estos patógenos (Cuevas et al., 2008). La habilidad del *S. aureus* para adaptarse a condiciones selectivas ha facilitado el desarrollo de resistencias en la cadena alimentaria, siendo muy importante su control desde el punto de vista de la seguridad alimentaria (Morente et al., 2016).

Entre los alimentos implicados en las intoxicaciones con *S. aureus* se encuentran carne y derivados, aves, huevo y derivados, ensaladas, leche y productos lácteos, y en especial aquellos alimentos que requieren mucha manipulación durante su preparación y que necesitan mantenerse por largos periodos de tiempo a altas temperaturas después de su cocinado. Las medidas para eliminar *S. aureus* son totalmente impracticables, dada su amplia difusión, por lo tanto, las medidas de control se basan en las normas de higiene y manipulación de los alimentos. Una correcta higiene de los alimentos está determinada por multitud de factores: condiciones de obtención de los mismos, características de los medios empleados para su transporte, temperaturas y condiciones de conservación, estructura de los locales donde se manipulan los alimentos, etc., destacando entre todos ellos la higiene de las prácticas de los manipuladores de alimentos. Todos los factores citados se vigilan y controlan a lo largo del proceso de obtención y manipulación de alimentos. Una vez que el alimento está listo para su consumo, su análisis microbiológico puede informar acerca del resultado real de todo el proceso, ya que la presencia de determinados microorganismos en los alimentos es una medida de su calidad sanitaria y además un indicador de la incorrección de las manipulaciones efectuadas, según estableció en su día el Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2015).

Uno de los seis peligros alimentarios incluidos en la regulación EC 2073/20052 sobre criterios microbiológicos son las toxinas estafilocócicas generadas como consecuencia de la presencia en el alimento del género *Staphylococcus* (Hennekinne et al., 2015), la bibliografía respecto a la contaminación por este género de los huevos y ovoproductos es casi inexistente (Stepień-Pyśniak, 2009).

Dado que el género *Staphylococcus* se encuentra presente de modo ubicuo en la naturaleza, los huevos pueden contaminarse en el proceso de producción, mientras que los ovoproductos y alimentos preparados pueden contaminarse después de procesados debido a una manipulación inadecuada. En general, las buenas prácticas de fabricación, almacenamiento, transporte y comercialización de los alimentos, hacen que al consumidor llegue un producto sano. Sin embargo, para poder garantizar la calidad de los alimentos es necesario un conocimiento tanto de las posibles fuentes de contaminación, como de los factores que afectan la multiplicación de los microorganismos dentro de los alimentos, así como la puesta a punto de métodos analíticos que permitan la rápida detección de posibles contaminaciones.

Existen diversos trabajos analizando el efecto protector de la cáscara de los huevos frente a la penetración de los microorganismos, la mayoría de éstos se centran fundamentalmente en la *Salmonella* (Chemaly & Salvat, 2011; Raspo et al., 2011; Howard et al., 2012). Algunos autores han descrito la influencia de diferentes factores (temperatura, humedad y tiempo de almacenamiento, naturaleza de la cáscara, tratamientos de limpieza de la cáscara...) en la contaminación del huevo a través de la cáscara (Theron et al., 2003; De Reu et al., 2006; Cabeza et al., 2011; Lasagabaster et al., 2011; Samiullah et al., 2013; Park et al., 2015). Ciertos trabajos describen específicamente el efecto protector frente a la microbiana de otras barreras de protección naturales presentes en el huevo, tales como determinadas proteínas (Réhault-Godbert et al., 2011) o la cutícula (Muñoz et al., 2015), incluso recientemente ha sido publicado un trabajo en el que se estudia el efecto protector del albumen de huevo frente a *Salmonella* (Baron et al., 2016). Sin embargo, es destacable los pocos trabajos que centran su atención en otros microorganismos (Theron et al., 2003; De Reu et al., 2006).

El desarrollo microbiano se ve afectado principalmente por la composición general del medio, y otros parámetros que forman parte del ambiente del producto, como el oxígeno del aire, el contenido de un determinado gas, la temperatura, las radiaciones

electromagnéticas, la humedad relativa o la presencia de ciertos inhibidores, entre otros. En este sentido han sido diversos los estudios realizados sobre microbiología predictiva relativos al efecto que distintos factores presentan sobre el crecimiento y la viabilidad de *Salmonella* sp en diferentes alimentos, carne de cerdo (Møller et al., 2013), huevo líquido (Huang, 2015) o manzana (Pérez-Rodríguez et al., 2014).

No obstante, hay muy pocos trabajos sobre otros microorganismos patógenos que no sólo se encuentran relacionados con los huevos, sino también con los ovoproductos, así como con los platos preparados con dichos productos. En concreto, existe muy poca bibliografía sobre microbiología predictiva relacionada con el género *Staphylococcus* (Hudson, 2014) y prácticamente ninguna relacionada con la industria de ovoproductos. Por tanto, se presenta este campo como una interesante vía de trabajo a fin de tener una visión global del comportamiento de este microorganismo a lo largo de toda la cadena productiva, desde la producción del huevo, pasando por los ovoproductos y finalizando en los platos preparados en los que se utilicen como ingrediente los derivados de huevo.

Todo esto resulta de gran importancia ya que el comportamiento de la bacteria cuando crece en medio líquido puede diferir del que presenta cuando se desarrolla en el interior de un alimento sólido, con una estructura característica. Por una parte el efecto de estar confinado en una estructura sólida puede modificar por sí mismo el metabolismo de la bacteria, como consecuencia de alteraciones en el desarrollo celular, en la morfología y en la permeabilidad de la membrana. Pero, además, el medio sólido presentará ciertas limitaciones difusionales, tanto para los nutrientes como para los productos del metabolismo molecular que ocasionará entornos celulares con concentraciones de sustratos y/o productos diferentes que modificarán las cinéticas e incluso activarán rutas metabólicas distintas de las que presentaría en un cultivo en medio líquido.

## **2.3 Técnicas de control en microbiología**

### **2.3.1 Cultivo en placa**

La primera referencia que se tiene del cultivo en placa es del Dr. Robert Koch (1876), que usó la gelatina como el primer agente gelificante para solidificar el medio líquido usado en el cultivo de las bacterias. También desarrolló el método de estriado, el método de recuento en placas para el aislamiento de bacterias y el método de sesgado para sembrar cultivos puros. El uso de la gelatina como agente de solidificación permitió

obtener muestras para el cultivo en placas, directamente o en alícuotas diluidas, en el medio gelificado, lo que facilitó el crecimiento de colonias individuales y el desarrollo de cultivos puros. La gelatina se podía obtener fácilmente y a un bajo costo, pero presentaba dos desventajas. En primer lugar, se debe incubar por debajo de 28 °C para mantenerla solidificada; el uso de temperaturas de incubación inferiores de 28 °C no es adecuado para muchas bacterias. En segundo lugar, muchas bacterias pueden descomponer la gelatina, lo que hace que se licúe e impida la reproducción de las colonias.

Consiste en la siembra de un volumen conocido de la muestra que se analiza. El resultado es función de una serie de factores como son el método de muestreo, el tipo de microorganismo, el tipo de alimento y las características del medio de cultivo. Los cultivos pueden hacerse tanto en masa como en superficie. Cada bacteria viable formará una colonia (Universidad de Navarra, 2016).

### **2.3.2 Microscopía**

La microscopía es el conjunto de técnicas y métodos destinados a hacer visible los objetos de estudio que por su tamaño están fuera del rango de resolución del ojo normal. El poder de resolución del ojo humano es de 0,2 mm es decir que para ver dos objetos separados estos deben estar como mínimo a esa distancia. El microscopio aumenta la imagen hasta el nivel de la retina, para captar la información. La resolución depende de la longitud de onda de la fuente luminosa, el espesor del espécimen, la calidad de la fijación y la intensidad de la coloración.

La primera persona que vio los microorganismos con algún detalle fue el constructor de microscopios aficionado Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723); este holandés usó microscopios simples contruidos por él mismo (se dedicaba a pulir lentes para fabricar sus microscopios que, como mucho, alcanzarían unos 300 aumentos). En 1677 escribe una carta a la Philosophical Transactions of the Royal Society of London en la que comunicaba sus recientes observaciones con los microscopios de su fabricación.

Desde ese momento, el microscopio óptico se ha transformado en uno de los medios más importantes para el diagnóstico de las infecciones.

La importancia del microscopio reside en que nos permite ver las células y ciertas estructuras intracelulares, y así poder diferenciarlas. Se podría decir que el microscopio es uno de los elementos más importantes en los laboratorios dedicados a la investigación

biológica, pues el hecho de haber superado los límites de la resolución del ojo humano le ha abierto al investigador un mundo hasta entonces ignorado.

Existen distintos microscopios ópticos que se diferencian en factores tales como la longitud de onda de la iluminación del espécimen, la alteración física de la luz que incide en la muestra y procesos analíticos que se aplican a la imagen final.

El microscopio electrónico de barrido o scanning electron microscope (SEM) consiste en un aparato que permite la visualización de la estructura de un material opaco mediante un haz de electrones en lugar de un haz de luz, cambio que permite obtener una mejor resolución respecto al resto de sistemas ópticos.

Para la observación, la muestra se recubrirá con una capa muy fina de oro, la cual le proporcionará las propiedades conductoras necesarias para la visualización. Durante la observación, se barre la muestra con haz de electrones, generándose en la superficie electrones retrodispersados, electrones secundarios, rayos X y otras partículas menos relevantes. Todo lo generado en la superficie será detectado gracias a un complejo de detectores que el SEM contiene en su interior: detector de electrones secundarios, detector de electrones retrodispersados y detector de energía dispersiva (para rayos X). El primero de los tres detectores permite obtener imágenes de alta resolución, el segundo con una menor resolución, pero con más contraste para visualizar la estructura de la superficie y el tercero que permite llevar a cabo un análisis de la composición. En caso de no necesitar realizar un análisis de la composición, se puede incrementar el grosor de la capa de oro, ya que con ello las imágenes tendrán una mayor resolución.

La tecnología SEM es aplicable a un gran número de áreas como la geología, evaluación de biomateriales, análisis de materiales metálicos, análisis y caracterización de alimentos, etc (PRC, 2016).

### **2.3.3 Técnicas moleculares**

Mientras que los métodos tradicionales de detección suelen tener una buena sensibilidad y especificidad son, sin embargo, métodos lentos, obteniéndose el resultado tras varios días (es dependiente del crecimiento del patógeno). Por ello, durante los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas moleculares, que además de ser específicas y sensibles, son rápidas. La composición genética de muchos microorganismos es

altamente variable, incluso dentro de una especie. Estas diferencias pueden ser utilizadas en tipificación, para distinguir cepas o aislamientos.

La secuenciación es una técnica de análisis molecular que permite determinar la composición y el orden de los nucleótidos que forman un fragmento de ADN. Para determinar la secuencia de un fragmento de ADN, es necesario multiplicar el número de copias de dicha molécula mediante una PCR (polymerase chain reaction) o usando vectores de clonación.

La determinación de la secuencia de nucleótidos del primer genoma humano (shot gun sequencing) puso de manifiesto las limitaciones de la secuenciación automática basada en el método de Sanger (Venter et al., 2001) para conseguir información a gran escala. Esto condujo al desarrollo de nuevos métodos de secuenciación masiva paralela, englobados bajo las denominaciones de secuenciación de siguiente (segunda) generación (NGS; Next Generation Sequencing) (Mardis, 2008; Metzker, 2010) y secuenciación de tercera generación (TGS; Third Generation Sequencing) (Niedringhaus et al., 2011), considerando la secuenciación automática de Sanger como de primera generación.

En las tres tecnologías, el ADN molde se prepara de manera similar, obteniendo, en primer lugar, una librería (esto es, una colección de fragmentos del ADN que se quiere secuenciar: por ejemplo, ADN total de un microorganismo). Para la obtención de la librería, este ADN se fragmenta al azar en segmentos de pequeño tamaño a cuyos extremos se ligan adaptadores cortos, los cuales aportan la homología necesaria para el apareamiento de los iniciadores (cebadores o “primers”) que serán utilizados posteriormente en las etapas de amplificación y secuenciación de la librería.

Las tecnologías de NGS/TGS han tenido un profundo impacto en microbiología de los alimentos (O’Flaherty & Klaenhammer, 2011). En el caso de microorganismos patógenos, la secuenciación de genomas completos ha revelado información esencial que podrá contribuir a su control. Entre las aportaciones de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva se incluyen la identificación de factores de virulencia; de mecanismos de supervivencia tanto en alimentos como en los tejidos del hospedador; de dianas para la rápida detección e identificación; y de componentes microbianos que puedan ser utilizados como antígenos para la obtención de vacunas o para el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

La secuenciación de genomas y la genómica comparativa de bacterias patógenas condujo a la descripción del “pan-genoma”, que representa el repertorio total de genes de una especie bacteriana. El pan-genoma incluye no sólo los genes que codifican funciones esenciales, sino también genes accesorios o dispensables presentes en una única cepa o en varias cepas. El pan- genoma es dinámico y va aumentando a medida que se secuencian más y más genomas de bacterias pertenecientes a la misma especie. Por ello puede ser varios órdenes de magnitud mayor que el genoma de una cepa individual.

La secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S es una poderosa herramienta para la identificación de especies bacterianas. Además, la secuenciación de alto rendimiento de genes ARNr 16S, utilizando plataformas NGS, permite estimar la diversidad bacteriana de un amplio rango de comunidades y nichos ambientales de manera sencilla y en un corto periodo de tiempo.

A pesar de sus ventajas, existen limitaciones a la secuenciación del gen ARNr 16S, ya que, este gen se encuentra altamente conservado, por lo que puede ser difícil distinguir especies estrechamente relacionadas y, más aún, cepas pertenecientes a la misma especie. Esta limitación puede superarse gracias a la secuenciación directa de todos los ácidos nucleicos presentes en una muestra (Rodicio, 2016).

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Caracterización de la microbiota nativa por técnicas moleculares

A fin de caracterizar la microbiota presente en la superficie de los huevos comerciales, se adquirieron en un supermercado local huevos “normales” marca Alimerka (procedentes de gallinas enjauladas), así como huevos “camperos” marca Granja Taramundi (procedentes de gallinas criadas en libertad), para evaluar la existencia de posibles diferencias.

La técnica empleada para identificar los microorganismos fue la secuenciación, de modo que el primer paso fue realizar la extracción del ADN.

#### 3.1.1 Extracción de ADN

En condiciones estériles, y empleando un vaso de precipitados de 1L, se sumergieron por separado 6 huevos de cada tipo en 500 mL de agua destilada, los huevos fueron frotados durante 2 min con un asa de siembra a fin de favorecer el paso de los microorganismos desde la superficie del huevo al agua. Esta agua se filtró con la ayuda de un kitasato, quedando de esta manera los microorganismos retenidos en un filtro de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Whatman). Asimismo, se realizó una muestra control del proceso de extracción de ADN a la que se le realizaron todos los pasos descritos para las muestras de huevos, dicha muestra se preparó filtrando 500 mL de agua destilada.

Posteriormente, se emplearon los filtros como material de partida para realizar la extracción de ADN con el kit Power Biofilm DNA Isolation (MO BIO Laboratories) siguiendo los pasos descritos a continuación:

1. Introducir el filtro en el Power Biofilm™ Bead Tube.
2. Adicionar al Power Biofilm™ Bead Tube 350  $\mu\text{l}$  de Solution BF1. *(El BF1 debe calentarse a 55°C durante 5-10 minutos y utilizarse aún caliente ya que puede contener precipitados).*
3. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de Solution BF2. Centrifugar a 13000 g durante 1 minuto (Eppendorf5415D). Incubar el Power Biofilm™ Bead Tube a 65°C durante 5

- minutos. Se emplea el equipo “Thermomixer Comfort Eppendorf” a 65°C y 1400 rpm.
4. Agitar la muestra siguiendo el protocolo para la opción: a) Power Lyzer™ 24 Homogenizer, empleando un molino de bolas Retsch MM 400 (Retsch), durante un tiempo de 5 min y una frecuencia (1/s) de 30.
  5. Centrifugar las muestras a 13000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente minuto (Eppendorf 5415D).
  6. Añadir 100 µl de solución BF3, centrifugar a 13000 g durante 1 minuto (Eppendorf 5415D). Incubar en nevera a 4°C durante 5 minutos.
  7. Centrifugar a 13000 g durante 1 minuto (Eppendorf5415D). Evitando el pellet y el filtro, transferir todo el volumen de sobrenadante a un tubo limpio de 2 mL Collection Tube. (Se obtienen aproximadamente entre 375-450 µl de sobrenadante).
  8. Añadir 900 µl de Solution BF4 y centrifugar a 13000 g durante 1 minuto (Eppendorf5415D). (*Calentar BF4 a 55°C durante 5-10 min antes de usar, ya que puede contener precipitados*).
  9. Recuperar todo el sobrenadante un Spin Filter y centrifugar a 13000 g durante 1 minuto (modelo y marca de la centrifuga). Se separa el filtro del eppendorf y se retira el líquido. Se repite el procedimiento 2 veces.
  10. Colocar el Spin Filter en un tubo nuevo de 2 mL Collection Tube.
  11. Añadir 650 µl de Solution BF5 y centrifugar a 13000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente (Eppendorf 5415D). Descartar el líquido.
  12. Añadir 650 µl de Solution BF6 y centrifugar a 13000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Desechar el líquido y volver a centrifugar a 13000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente (Eppendorf 5415D).
  13. Colocar el Spin Filter en un 2 mL Collection Tube nuevo. Añadir 100 µl de Solution BF7 al centro de la membrana del filtro y centrifugar a 13000 g durante 1 minuto (Eppendorf 5415D).
  14. Descartar el filtro y conservar el líquido que contiene el DNA a -20°C.

### **3.1.2 Amplificación del ADN**

Se usa el Kit de metagenómica *Ion 16S Metagenomics Kit (Ion Torrent, Life Technologies)*. Este kit incluye material para amplificar por un lado las regiones V2-4-8,

y por otro las regiones V3-6, 7-9 pertenecientes al gen que codifica el ARNr 16s. Cada una se amplifica con un set de primers diferente. Es decir, si se pretende (como en este caso) amplificar todas las regiones de una muestra se deben preparar dos alícuotas de cada una de las muestras, una para amplificar las regiones V2-4-8 y para las regiones V3-6; V7-9.

**1.- Preparación de la solución madre:** Se prepara una solución madre en función del número de muestras y de la concentración de ADN que se va a emplear. Se prepara también (además del control del proceso de extracción ya comentado y al que se le hace también el proceso de amplificación) un control negativo para la PCR. La solución madre se prepara para una muestra de más por lo que se cuentan como si fuesen 5 (2 muestras + 1 Control negativo de extracción + 1 control negativo PCR) llevará:

Solución madre A (Para el primer V2-4-8):

- Master Mix=  $15 \mu\text{L} \times 5 \text{ muestras} = 75 \mu\text{L}$
- Primer V2-4-8 =  $3 \mu\text{L} \times 5 \text{ muestras} = 15 \mu\text{L}$
- Agua de ampolla=  $1 \mu\text{L} \times 5 \text{ muestras} = 5 \mu\text{L}$

Solución madre B (Para el primer V3-6, V7-9):

- Master Mix=  $15 \mu\text{L} \times 5 \text{ muestras} = 75 \mu\text{L}$
- Primer V2-4-8 =  $3 \mu\text{L} \times 5 \text{ muestras} = 15 \mu\text{L}$
- Agua de ampolla=  $1 \mu\text{L} \times 5 \text{ muestras} = 5 \mu\text{L}$

Una vez preparada la solución madre se agita bien para mezclar los reactivos. Se colocan los tubos de PCR y se añaden  $19 \mu\text{L}$  de solución madre A en cada tubo y  $11 \mu\text{L}$  de muestra o control. Se repite la misma operación para la solución madre B en otros tubos distintos.

Las soluciones del kit, vienen concentradas: Master mix (2x) y Primer (10x), pero las cantidades necesarias para el método ya vienen corregidas en el protocolo (Tabla 3).

**Tabla 3. Contenido del tubo de PCR indicado por el protocolo**

Component	Sample or positive control volume	Negative control volume
2X Environmental Master Mix	15 µL	15 µL
16S Primer Set (10X) <sup>[1]</sup>	3 µL	3 µL
DNA (sample or diluted <i>E. coli</i> DNA control)	2-12 µL sample or 2 µL diluted control <sup>[2]</sup>	N/A
Negative Control (water)	to 30 µL	to 30 µL
<b>Total</b>	<b>30 µL</b>	<b>30 µL</b>

**2.- Amplificación de las muestras por PCR:** se realizaron 25 ciclos de amplificación siguiendo el protocolo indicado en el Kit empleando el equipo “PCR Thermo Fisher” (Tabla 4):

**Tabla 4. Ciclos de amplificación de PCR.**

Stage	Temperature	Time
Holding	95°C	10 min
Cycling 18–25 cycles <sup>[1]</sup>	95°C	30 sec
	58°C	30 sec
	72°C	20 sec
Holding	72°C	7 min
Holding	4°C	∞

### **3.-Electroforesis de los amplicones (productos de PCR)**

Se comprobaron los resultados obtenidos en la amplificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

#### **Preparación del gel de agarosa**

Disolver la agarosa en 50 mL de Buffer TBE 1% de modo que el gel tenga una concentración final de 2% de agarosa. Calentar en el microondas hasta fundir la agarosa. Dejar enfriar un poco y añadir Simply Safe<sup>TM</sup>. Agitar suavemente para mezclar y verter

el gel de agarosa en una cubeta y colocar el peine correspondiente. Dejar enfriar hasta obtener el gel. El gel de agarosa al 2% se coloca en una cuba de electroforesis y se añade Buffer TBE 1% hasta que quede sumergido.

### **Preparación de las muestras antes de ser cargadas:**

-Preparar en cada tubo de PCR, 30 µl de muestra y añadir agente densificante (Merk) en una concentración final 1x.

- Preparación de marcadores: Se emplean unos marcadores genéticos como patrones de referencia del tamaño de los fragmentos de ADN (Life Technologies).

- Añadir 3 µl de marcador y 27 µl de agua, más el densificante en la misma concentración que en el caso de las muestras.

### **Para cargar las muestras:**

Cada muestra se carga en una calle diferente del gel. Y se corre el gel a 90 V durante 21 min a 41 mA empleando el equipo “Correc VWR PowerSource” (BioRad).

Una vez acabada la electroforesis se visualizan los fragmentos de DNA mediante luz UV con un transiluminador (UVP, Analitik Jena Company) y se realiza una fotografía de la imagen. Las bandas obtenidas se recortan y se guardan congeladas en un Eppendorf para su posterior purificación.

El kit con el que se lleva a cabo la purificación de las bandas es el E.Z.N.A gel extraction (Omega Bio-tec).

## **3.1.3 Secuenciación masiva del gen ARNr 16S mediante el sistema Ion PGM™ System**

Finalizadas las fases de extracción, amplificación y purificación del ADN de las muestras se procede a la secuenciación de masiva del gen ARNr 16S empleando el sistema Ion PGM™ System, donde se diferencian las siguientes fases:

1. Preparación de librerías de ADN
2. Amplificación por PCR en emulsión (PCRe)
3. Secuenciación
4. Análisis de datos

## 1. Preparación de librerías

La preparación de las librerías de ADN consiste en la fragmentación del ADN obtenido en la fase de purificación con la finalidad de obtener fragmentos más pequeños. Para la construcción de la librería a cada fragmento de ADN obtenido se le acopla un marcador o barcode y dos adaptadores (A y B) como se indica en la Figura 4. Cada librería corresponde a una colección diferente de fragmentos de ADN que se quieren secuenciar y es exclusiva para cada muestra.

La función del marcador es identificar la muestra a la cual pertenece el fragmento de ADN y será el mismo para todos los fragmentos de ADN obtenidos en una muestra, actúa por tanto como un código de identificación. Los adaptadores A y B se ligan a los extremos y proporcionan las secuencias de hibridación necesarias (primers o cebadores) que serán empleadas posteriormente en las fases de amplificación y secuenciación de los fragmentos de la librería.

Estos adaptadores son comunes a todas las muestras tratadas. El adaptador B contiene biotina, necesaria para las fases de enriquecimiento y desnaturalización de la PCR.



Figura 4. Ejemplo de marcadores o barcodes.

## 2. Amplificación por PCR en emulsión o PCRe

En la PCRe cada una de las librerías de fragmentos de ADN obtenidos se inmoviliza en unas perlas denominadas, beads, que están recubiertas con un material que permite la fijación del ADN que interacciona con el marcador A del fragmento. Estas perlas se encuentran en el interior de las micelas formadas por una emulsión aceite-agua que contiene además los reactivos necesarios para la PCR.

Es necesario que la amplificación que se realiza dentro de cada micela sea clonal y no policlonal. Para lograr una amplificación clonal es necesario añadir la proporción de ADN justa para que la relación asegure que a cada perla le corresponde un único fragmento de ADN. Esto se logra añadiendo una menor cantidad de fragmentos de ADN en relación al

número de micelas presentes en la emulsión. Como resultado se obtendrán micelas con un único fragmento de ADN y micelas libres de fragmentos.

Las micelas libres de fragmentos tienen que ser eliminadas mediante una fase posterior de enriquecimiento, previa a la PCR. En este punto, es de gran importancia la biotina unida al marcador B. Para el enriquecimiento se adicionan bolas magnéticas que tienen un receptor afín a la biotina. La unión biotina-receptor permitirá separar las micelas que posean un fragmento de ADN en su interior de las que no lo tengan (Figura 5).

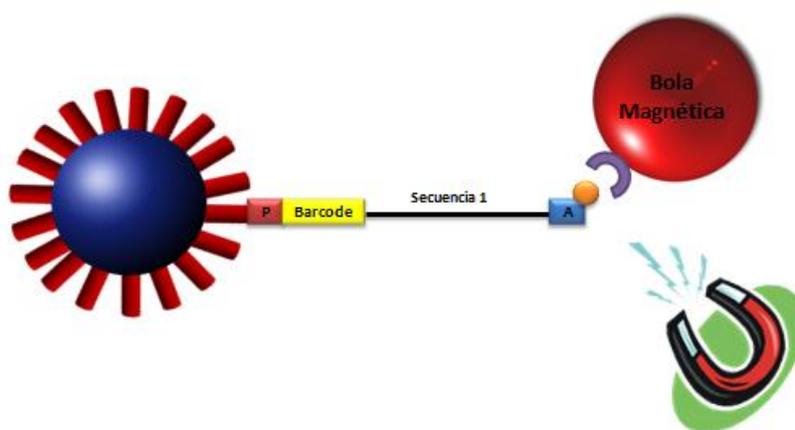


Figura 5. Esquema de la unión biotina-receptor

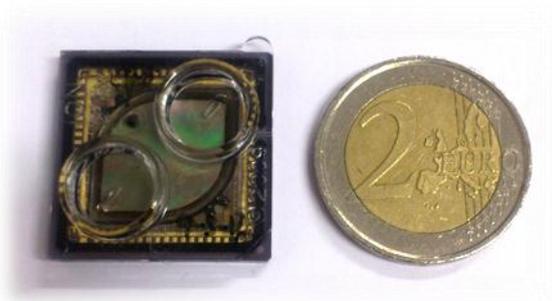
Una vez aisladas las micelas con los fragmentos de ADN comienza la fase de amplificación cuya finalidad es conseguir una perla repleta de fragmentos de ADN amplificados monoclonalmente. Finalmente, se procede a la desnaturalización de los fragmentos y a su aislamiento del mismo modo que en el enriquecimiento, adicionando bolas magnéticas que se unen a los fragmentos que contengan el marcador B, la unión biotina-receptor permitirá de nuevo separar los fragmentos de interés.

### 3. Secuenciación masiva por Ion PGM™ System

Esta técnica fue desarrollada por Ion Torrent Systems Inc. y salió al mercado en febrero de 2010. Se basa en la detección del protón (ion hidrógeno) que se libera como subproducto cada vez que un nuevo nucleótido se incorpora a la cadena de ADN en crecimiento. El protón es detectado por un sensor de iones que convierte directamente la señal química (A, C, G, T) en información digital (0, 1) acerca de la secuencia del ADN.

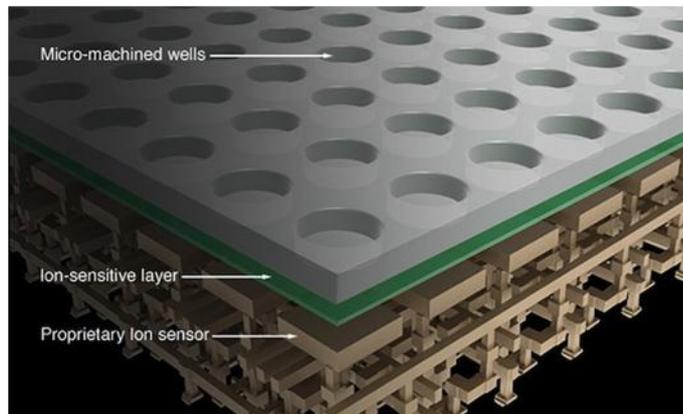


**Figura 6. Secuenciador Ion Torrent**



**Figura 7. Fotografía del microchip**

Las perlas repletas de fragmentos de ADN se introducen en los pocillos de un micro-chip semiconductor (Figuras 7 y 8) de manera que cada pocillo contiene múltiples copias de un mismo fragmento que actuará como molde en la reacción de secuenciación (secuenciación por síntesis). Por debajo de los pocillos se encuentra una capa sensible a iones y por debajo de ésta un sensor de iones (IS-FET), todo ello contenido en el chip semiconductor, que es similar al utilizado en la industria electrónica. En esencia, la plataforma Ion Torrent puede definirse como el pHmetro de fase sólida más pequeño que existe.



**Figura 8. Esquema del microchip**

A continuación, se bañan los pocillos con una solución que contiene solo uno de los cuatro dNTPs.

- Si este nucleótido es complementario al último nucleótido no apareado presente en el ADN molde, será incorporado a la cadena de ADN en crecimiento, liberándose un protón. Ello origina un cambio de pH que será detectado por el sensor iónico.

- Si el nucleótido no es complementario, no habrá liberación de protón.

Este proceso se repite cada 15 segundos con una nueva solución de nucleótido. Las moléculas de dNTPs no incorporadas se eliminan después de cada ciclo, antes de introducir el nuevo dNTP.

- Si en el ADN molde existen repeticiones sucesivas de un mismo nucleótido, el mismo número de copias del nucleótido complementario será incorporado durante un único ciclo. Esto conduce a una liberación proporcional de protones y, en consecuencia, a un aumento proporcional de la señal.

En otras palabras, la liberación o no de iones hidrógeno indica si uno, varios o ningún nucleótido ha sido incorporado. Las señales generadas en los pocillos se transmiten directamente a un ordenador (como pulsos eléctricos), sin necesidad de ser procesadas durante la transferencia.

Los datos obtenidos son analizados con el software Ion Reporter™ de Life Technologies.

## **3.2 Microorganismo, medios y condiciones de cultivo**

Todos los procedimientos descritos a continuación se realizaron en condiciones de esterilidad, empleando una campana de flujo laminar (Telstar PV-100) y un autoclave modelo AES-75 (Raypa) para esterilizar el material. Además, todos los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado además de un cultivo control en todos los casos.

### **3.2.1 *Staphylococcus warneri***

Se emplea *Staphylococcus warneri* como microorganismo modelo ya que pertenece al mismo género que *Staphylococcus aureus*, patógeno oportunista que se encuentra en la piel humana, y por tanto puede aparecer en el huevo (dos Santos, 2007). Se seleccionó *S. warneri*, porque, al contrario que *S. aureus* que pertenece al grupo de “riesgo 2”, está clasificado dentro de los microorganismos de “riesgo 1”, es decir, “riesgo individual y poblacional escaso o nulo”.

Se utilizó una cepa comercial de *Staphylococcus warneri*, (CECT 236), suministrado liofilizado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Se añadieron al liófilo 0.2-0.3 mL del medio líquido estéril NB (Nutrient Broth, Biokar) y se resuspendió cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aire. Se mantuvo la suspensión durante 20-30 minutos hasta conseguir su rehidratación completa.

De la suspensión se sembraron placas de medio sólido (NB) por el método de siembra en estría o agotamiento. Las placas se incubaron hasta el día siguiente a 30 °C.

Para realizar el stock se inocularon 2 colonias en 100 mL de medio líquido (NB) en matraces Erlenmeyer de 500 mL con una relación medio:volumen de 1:5 y se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante 24 horas en un agitador orbital (Excella E24, Incubador Shaker Series, New Brunswick Scientific). Como método de conservación se prepararon varios stocks del cultivo de *S. warneri*. Para recuperar la biomasa, un volumen de 1 mL de medio inoculado se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos (Eppendorf5 415D), una vez desechado el sobrenadante, se volvió a añadir otro mL repitiendo el mismo proceso. Para proceder a su congelación, las células se resuspendieron en NB fresco y glicerol al 40% (v/v) en proporción 1:1. Estas suspensiones celulares se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Tanto para el cultivo en medio líquido como en sólido se utilizó el medio Nutrient Broth citado anteriormente cuya composición es la siguiente: 10g/l de triptona, 5g/l de cloruro de sodio y 5g/l de extracto de carne (pH 7,2).

Para los medios líquidos se utilizaba agua destilada y NB al 2% (p/v), y para los medios sólidos la misma proporción de NB añadiéndole agar bacteriológico tipo europeo (VWR Chemicals) al 3% (p/v).

## **3.2.2 Medios y condiciones de cultivo**

### **3.2.2.1 Medios líquidos**

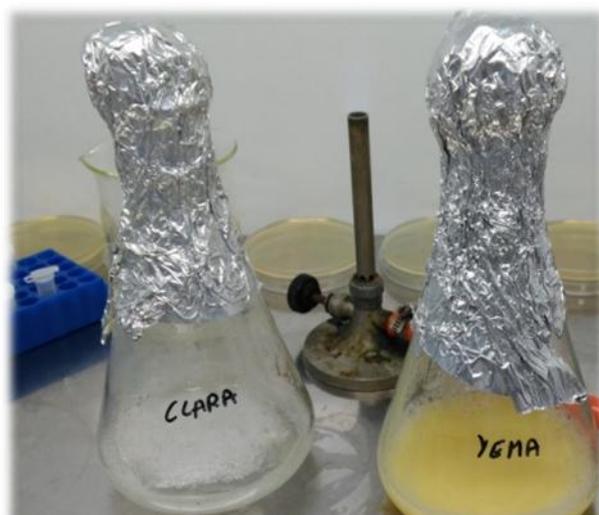
#### **a) Nutrient Broth**

Para obtener la curva de crecimiento bacteriano de *S. warneri*, se inocularon 2 colonias en 100 mL de medio líquido (NB) en matraces Erlenmeyer de 500 mL con una relación

medio:volumen de 1:5 y se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante 27 horas en un agitador orbital en aerobiosis.

#### b) Huevo líquido

Para el estudio del crecimiento de *S. warneri* en huevo líquido se realizaron dos inóculos diferentes, por un lado, la yema y por el otro la clara (Figura 9). Los huevos utilizados se lavaron con etanol al 96% para no contaminar el cultivo. Una vez separadas la yema de la clara se realizaban mezclas de 10 mL de yema o clara con 90 mL de agua destilada en un matraz aforado de 500 mL (relación 1:5 v/v). Tras homogenizarse las mezclas en un agitador magnético (Magnetic Stirrer) a 300 rpm durante 5 minutos, los matraces se incubaron también a 37°C y con una agitación de 250 rpm.



**Figura 9. Matraces con los dos medios de huevo líquido.**

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *S. warneri* en la yema se llevó a cabo también el experimento a 25 °C y a 13 °C.

Regularmente (cada 1 o 2 horas), se tomaron 100 µl del medio de cultivo (tanto en NB como en huevo líquido), siendo el volumen total retirado menor del 10% del volumen inicial. A continuación, se sembraron diluciones seriadas en cloruro de sodio (NaCl) al 0.7% desde 1:100 hasta 1:100000000 (dependiendo de las horas de cultivo) con la ayuda de un asa de Digrafsky hasta conseguir su distribución homogénea. Estas placas se incubaron a 30 °C durante 24-48 horas para su posterior conteo.

Con la media de los datos de concentración de microorganismos obtenidos en cada muestra (ufc/mL) se realizó la curva de crecimiento bacteriana a cada temperatura. La desviación estándar fue en todos los casos inferior al 70%.

### 3.2.2.2 Medio sólido

Como alimento modelo para el estudio del crecimiento de *S. warneri* en ovoproductos se realizaron tortillas simuladas. La mezcla estaba compuesta por 20 mL (18,5g) de huevo batido (Stomacher 80 Biomaster, LabSystem) y 30 g de patata pelada y cocida en agua hirviendo. A esta mezcla se le añadió un preinóculo de unas  $7,2 \times 10^6$  ufc/mL (que previamente se preparó conforme a lo explicado en el apartado 3.2.2.1 a). Para no añadir medio de cultivo a las tortillas se centrifugaron 2 mL del preinóculo a 13000 g durante 5 minutos (Eppendorf5415D). Este pellet se resuspendió en 1 mL de NaCl 0.7%, y se volvió a centrifugar a 13000 g durante otros 5 minutos (Eppendorf 5415D). Para añadir el pellet resultante a la mezcla de huevo y patata, éste se resuspendió varias veces en huevo añadiéndose el contenido del tubo Eppendorf a la mezcla. Esta mezcla realizada en una bolsa de Stomacher fue homogeneizada durante 60 segundos.

Con la mezcla de patata y huevo ya inoculada, se rellenaron jeringuillas de 10 mL hasta aproximadamente los 8 mL. Para simular la superficie y el interior de la tortilla, se tapó por la parte del émbolo con algodón (superficie aerobia de la tortilla) y con papel de aluminio y parafilm se tapó la punta de la jeringa (interior anaerobio de la tortilla). Las tortillas así preparadas (Figura 10) se cocinaron durante 8 minutos a 60 °C en una estufa (Memmert). Posteriormente se analizaron 3 tortillas recién hechas y otras 3 a las 24 h.

Para el análisis se pesó 1 g de tortilla de la zona anaerobia y 1 g de la zona aerobia de cada tortilla, se diluyó con 9 mL de NaCl 0.7% y se realizaron siembras de diluciones seriadas para ver la concentración de *S. warneri* presente. Estas placas se incubaron durante 24 h a 30 °C.

En este caso no se hizo un control, porque la carga microbiana que se añade hace irrelevante lo que pueda haber en el huevo y la patata está estéril al hervirla.



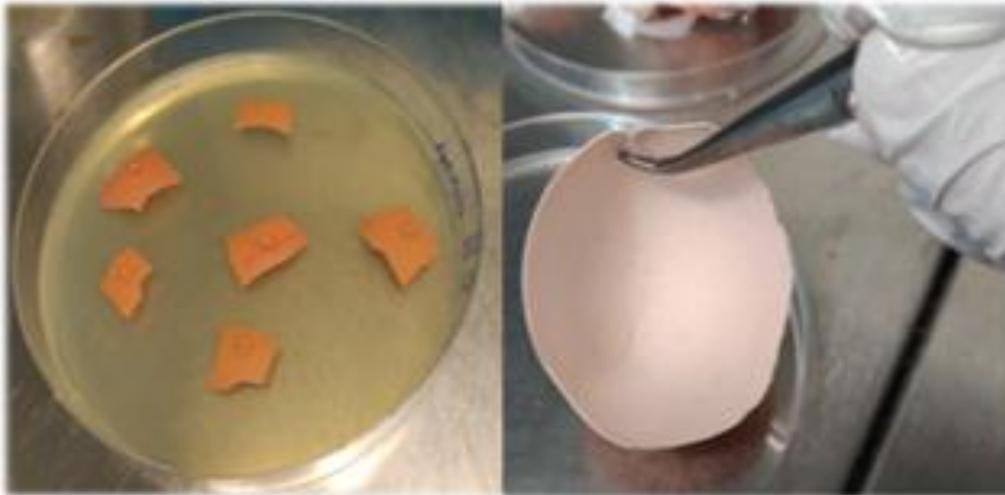
**Figura 10. Fotografía de las tortillas de patata simuladas**

### **3.2.3 Experimentos de transporte de microorganismos**

Previa la realización de un preinóculo de *S. warneri* en medio líquido NB, según el apartado 3.2.2.1 a), y una vez que en el medio alcanzó las  $10^7$ - $10^8$  ufc/mL, se realizaron procedimientos diferentes:

#### **Pruebas previas:**

- Sobre placas de agar de Nutrient Broth se colocaron fragmentos de cáscara de huevo (previamente lavados con etanol al 96%) en unos casos con membranas y en otros se les había quitado la membrana externa y la interna. Se depositaron sobre ellos 2  $\mu$ L del preinóculo, en otras se sembró una colonia directamente con el asa de siembra y otras placas se dejaron como control (Figura 11). Los fragmentos de huevo se observaron posteriormente en el microscopio electrónico de barrido.
- Fragmentos de huevo obtenidos de la misma manera se incubaron junto con el medio líquido durante una noche observándose también al SEM.



**Figura 11.** A la izquierda, fragmentos de cáscara inoculados con 2 $\mu$ L de medio. A la derecha, proceso de quitarle las membranas testáceas al huevo.

### **Crecimiento de *S. warneri* en huevos inoculados**

- En vasos de precipitado de 100 mL se sumergieron huevos en 40 mL tanto de medio inoculado como de medio sin inocular, actuando éstos de control, durante 1 hora (figura 12). Una vez transcurridos los 60 minutos se introdujo cada huevo por separado en una bolsa de Stomacher estéril para conservar la humedad y se incubaron a 20 °C durante 16 días.

Se analizaron 4 huevos de cada tipo a los 2 y a los 16 días de la siguiente manera:

- Se abrieron las bolsas, se añadió un volumen de 10 mL de NaCl 0.7% y se masajeó el huevo durante 1 minuto para arrastrar las bacterias que hubiesen quedado adheridas a la cáscara.
- Una vez transcurrido el minuto se sacó el huevo y se procedió a sembrar 100  $\mu$ l del contenido de la bolsa en las placas de Petri con agar NB haciendo también diluciones seriadas 1:10 y 1:100 (v/v) en NaCl 0.7%.
- El huevo se lavó con etanol al 96%, se partió y su contenido se homogenizó con un Stomacher 80 Biomaster (LabSystem) durante 30 segundos.

- Posteriormente se sembraron 500  $\mu\text{l}$  de huevo directamente sobre las placas de NB y diluciones en NaCl 0.7% 1:10 (v/v), sembrándose de ésta tanto 500 como 100  $\mu\text{l}$ .

Una muestra de cáscara sin lavar con etanol a los 2 días también se llevó al microscopio electrónico de barrido.



Figura 12. A la izquierda, huevos en medio inoculado. A la derecha, huevos en medio estéril.

### 3.2.4 Cuantificación de microorganismos

Para estudiar el crecimiento de *S. warneri* en cada medio se siembra un volumen conocido de la muestra que se analiza. Dependiendo de las concentraciones que se estimase que pudiese haber en cada cultivo, se realizaron también diluciones seriadas en cloruro de sodio (NaCl) al 0.7%. Con la ayuda de un asa de Digralsky se extiende el volumen hasta conseguir su distribución homogénea. Estas placas se incubaron a 30 °C durante 24-48 horas para su posterior conteo. Las placas se siembran al menos por duplicado.

### **3.2.5 SEM**

Para la visualización de las muestras en SEM es necesario dejar secar los fragmentos de cáscara de huevo con antelación y cortarlos en trozos más pequeños para poder colocarlos sobre las setas. Por último, se recubren con oro (Sputtering Balzers SCD 004), tras lo cual pueden observarse en el SEM (MEB JEOL-6610LV).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Caracterización de la microbiota nativa presente en huevos comerciales

Los datos obtenidos y analizados con el software Ion Reporter™ de Life Technologies para los huevos procedentes de gallinas enjauladas (Alimerka) y los huevos procedentes de gallinas camperas (Granja Taramundi) muestran las diferencias que se pueden observar en las Figuras 13 y 14 y la Tabla 5. Para elaborar los diagramas, los datos obtenidos a partir de las secuencias de ADN han sido identificados por el software con un grado de coincidencia del 97% y además han sido identificados aquellos fragmentos de ADN que aparecen en número mayor de 10 copias después de la amplificación y con una longitud mínima de 150 pb.

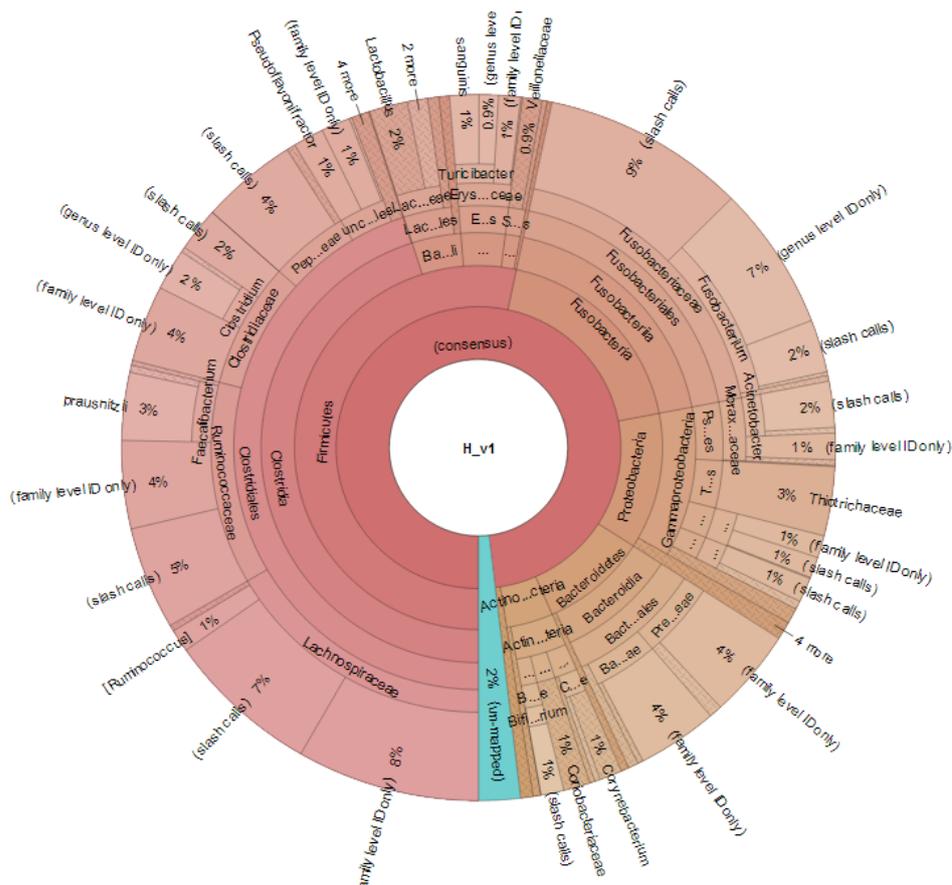
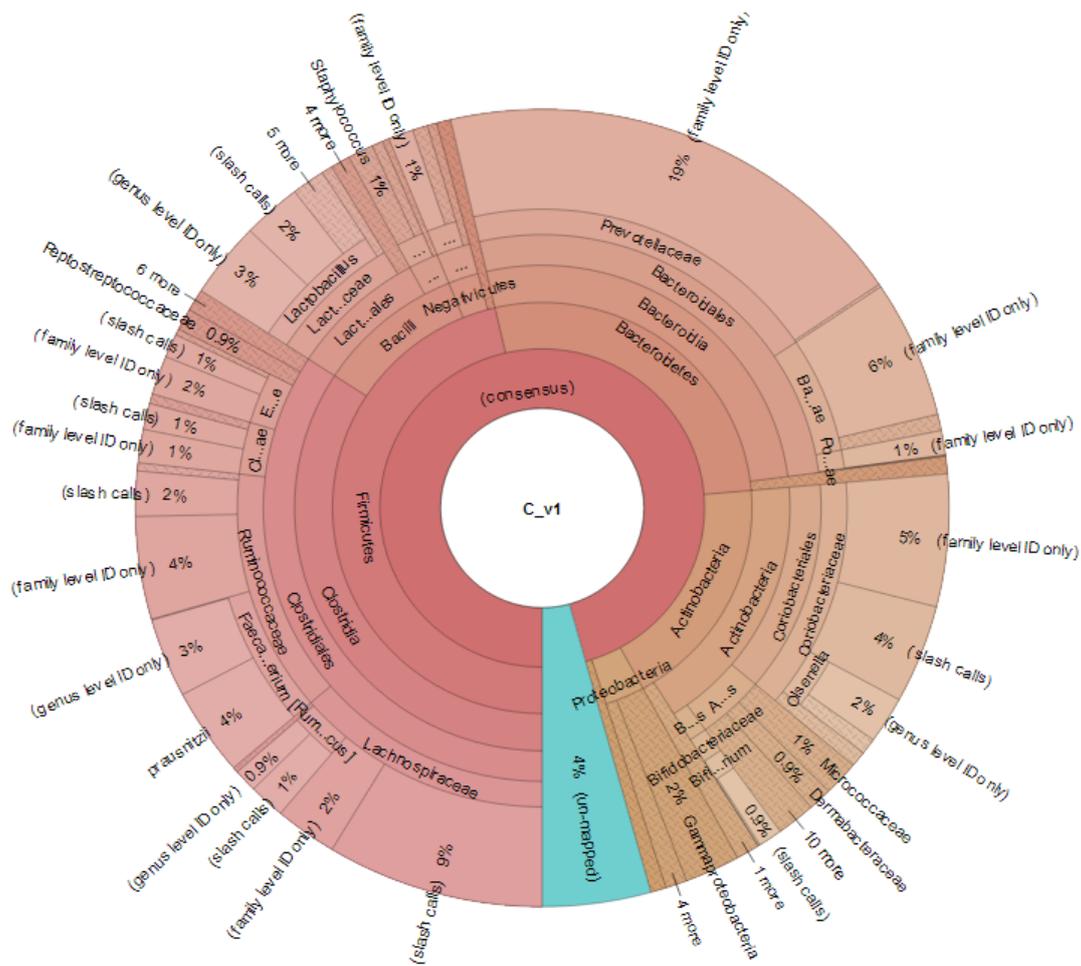


Figura 13. Diagrama de la microbiota presente en huevos procedentes de gallinas enjauladas



**Figura 14. Diagrama de la microbiota presente en huevos procedentes de gallinas camperas**

El software ha clasificado 8 filos diferentes de bacterias en los huevos camperos y 9 filos distintos en el caso de la otra muestra. Dentro de eso filos ha llegado a identificar 69 géneros diferentes que se encuentran en la cáscara de ambos tipos de huevos, de los cuales 37 aparecen en ambos, 20 solamente en los huevos tipo campero y 12 en los de gallinas enjauladas. Esto indica que hay una mayor diversidad en la microbiota de la cáscara de los primeros que en los segundos, lo cual parece lógico ya que las gallinas camperas salen al aire libre a picotear, escarbar y darse baños de arena y además cada una cuenta con hasta 4 metros cuadrados de superficie al exterior. Al contrario de lo que ocurre con las gallinas enjauladas que se encuentran confinadas en un espacio reducido.

Tabla 5. Distribución de géneros en relación a la clase de huevos.

Géneros que comparten ambas clases		Géneros que sólo aparecen camperos	Géneros que sólo aparecen en huevos procedentes de gallinas enjauladas
<i>Acetanaerobacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Alistipes</i>	<i>Aeriscardovia</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Gallicola</i>	<i>Atopostipes</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Aerococcus</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Brachybacterium</i>	<i>Facklamia</i>
<i>Anaerobiospirillum</i>	<i>Jeotgalicoccus</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Gallibacterium</i>
<i>Atopobium</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Erysipelatoclostridium</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Paenalcaligenes</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Megamonas</i>	<i>Faecalicoccus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Blautia</i>	<i>Olsenella</i>	<i>Faecalitalea</i>	<i>Psychrobacter</i>
<i>Butyricoccus</i>	<i>Parasutterella</i>	<i>Gemmiger</i>	<i>Raoultella</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Janibacter</i>	<i>Turicibacter</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Pseudoflavonifractor</i>	<i>Mogibacterium</i>	<i>Tyzzereella</i>
<i>Cronobacter</i>	<i>Roseburia</i>	<i>Mucispirillum</i>	
<i>Desulfovibrio</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Nocardiopsis</i>	
<i>Dietzia</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Parabacteroides</i>	
<i>Enorma</i>	<i>Subdoligranulum</i>	<i>Paraprevotella</i>	
<i>Enterococcus</i>	<i>Sutterella</i>	<i>Salinicoccus</i>	
<i>Eubacterium</i>		<i>Slackia</i>	
<i>Faecalibacterium</i>		<i>Virgibacillus</i>	
<i>Flavonifractor</i>		<i>Yaniella</i>	

En ambas muestras aparecen géneros habitualmente descritos en la bibliografía en huevos, tales como *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Campylobacter* (Caso 2015; Stadelman et al., 1990). Puede llamar la atención que no aparece el género *Salmonella*, aunque no debería resultar extraño, ya que España junto con otros países de la UE está llevando a cabo un programa de erradicación y actualmente se estima que su incidencia media en granjas de cría y engorde se encuentra en torno al 1% en España (Magrama, 2013; Magrama 2016). Esto confirma la idea de que es necesario el estudio del transporte a

través de la cáscara y el crecimiento microbiano en ovoproductos en géneros diferentes a *Salmonella*, que hasta ahora ha sido el frecuentemente estudiado.

En cuanto al género *Staphylococcus* que es al que pertenece la bacteria modelo que estamos utilizando, éste representa el 1% de todas las secuencias consenso con las que el software ha llegado a unos resultados correspondientes a la muestra de huevos camperos. Este 1% de *Staphylococcus* corresponde con el 69% de la familia Staphylococcaceae, el 58% del orden Bacillales, el 10% de la clase Bacilli y el 2% del filo Firmicutes (Figura 14).

Como se puede ver en la Figura 15 el 47% de los *Staphylococcus* encontrados en este caso son “slash calls”, esto significa que el software ha llegado a identificarlos como especies, pero la secuencia identificada es común a varias especies de este género, por lo que no se puede asegurar a qué especie corresponden. Un 29% corresponden a la especie *S. equorum*, un 0,7% a *S. sciuri* (porción morada) y un 0,6% a *S. lentus* (porción fucsia). El 23% restante se corresponde a secuencias que el programa sólo ha podido llegar a identificar a nivel de género.

*S. sciuri* es un microorganismo comúnmente aislado tanto en la piel humana como de otros animales, pero se ha visto que en cepas de aves de corral representan un reservorio de genes de resistencia a meticilina (Nemaghaire, 2014). Esto es importante ya que son patógenos humanos responsables de endocarditis, peritonitis, shock séptico, infección del tracto urinario, enfermedad inflamatoria pélvica y las infecciones de la herida (Revista Vía Clínica, 2016). Las otras dos especies encontradas no se han descrito como patógenos hasta el momento.

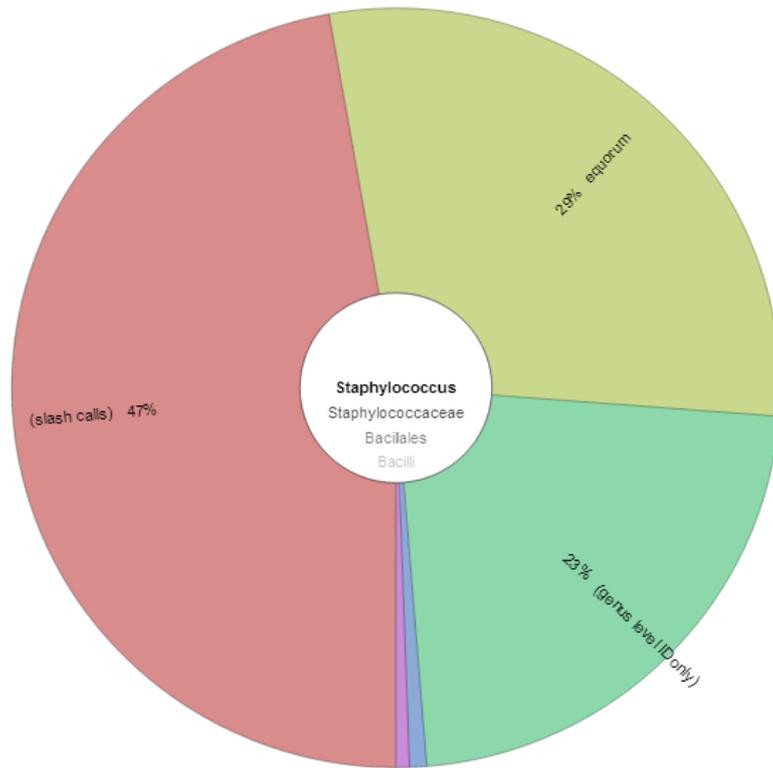


Figura 15. Vista en detalle del género *Staphylococcus* en huevos camperos.

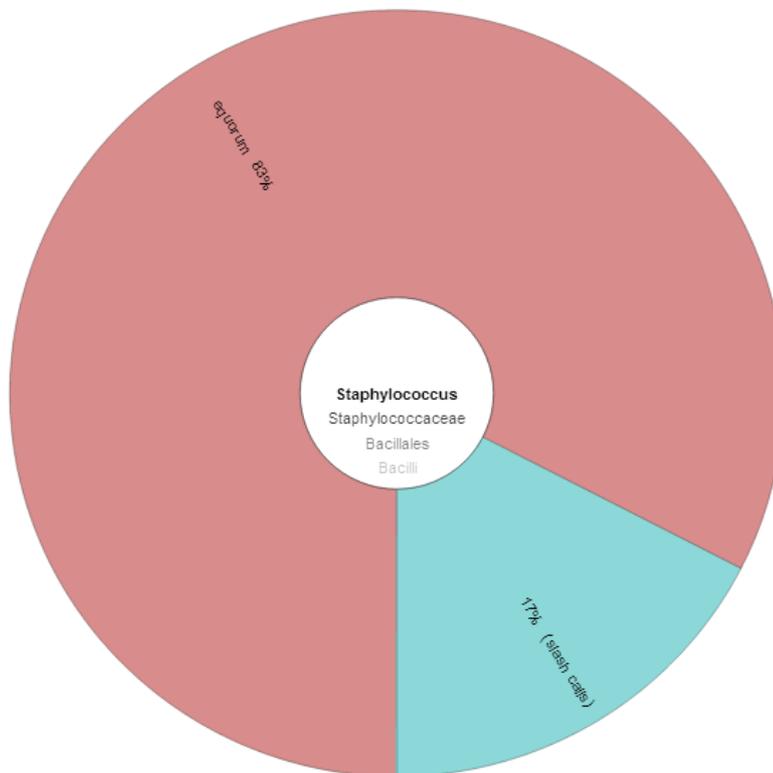


Figura 16. Vista en detalle del género *Staphylococcus* en huevos procedentes de gallinas enjauladas.

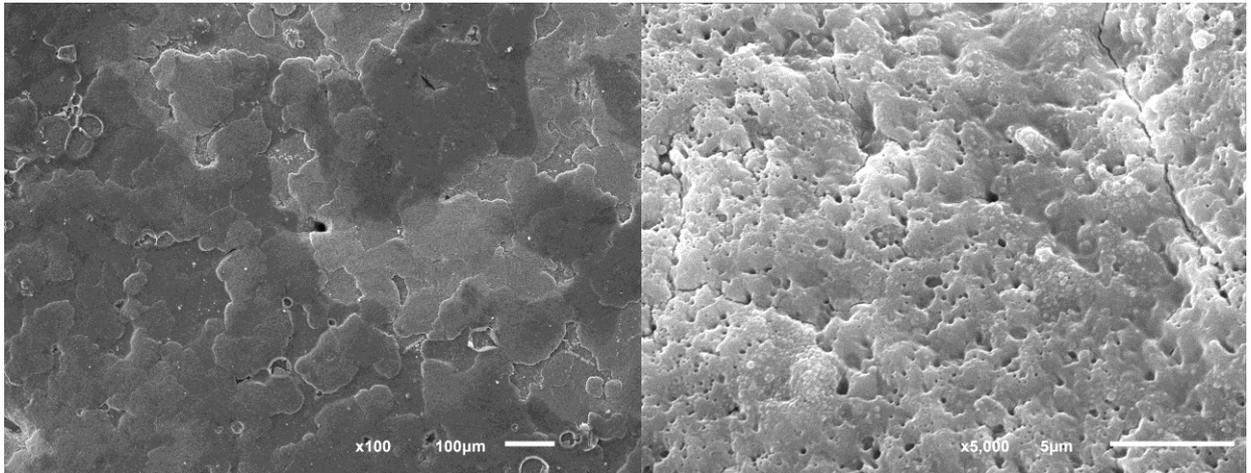
En el caso de los huevos marca Alimerka el género *Staphylococcus* representa el 0,4% de todas las secuencias consenso a las que el software ha llegado. De este 0,4% *Staphylococcus* se corresponde con el 87% de la familia Staphylococcaceae, el 78% del orden Bacillales, el 10% de la clase Bacilli y el 0,7% del filo Firmicutes (Figura 13). En este caso el 83% corresponde con la especie *S. equorum* y sólo un 17% corresponde con “slash calls” (Figura 16).

Con esta información podríamos determinar a priori que los huevos comerciales procedentes de gallinas enjauladas son más seguros que los de tipo campero, ya que estos presentan menos biodiversidad en su microbiota y dentro del género *Staphylococcus* parece que las especies son menos peligrosas. De todos modos, no se puede olvidar que a este género pertenecen muchas bacterias patógenas oportunistas como *S. aureus* o incluso el microorganismo modelo empleado en este trabajo *S. warneri* (Caso, 2015).

## 4.2 Comportamiento de patógenos en huevos y ovoproductos

### 4.2.1 Transporte de microorganismos a través de la cáscara

A continuación, se muestran imágenes (Figuras 17 y 18) de la cáscara de huevos de gallinas enjauladas que no han sido sometidos a ningún tratamiento:



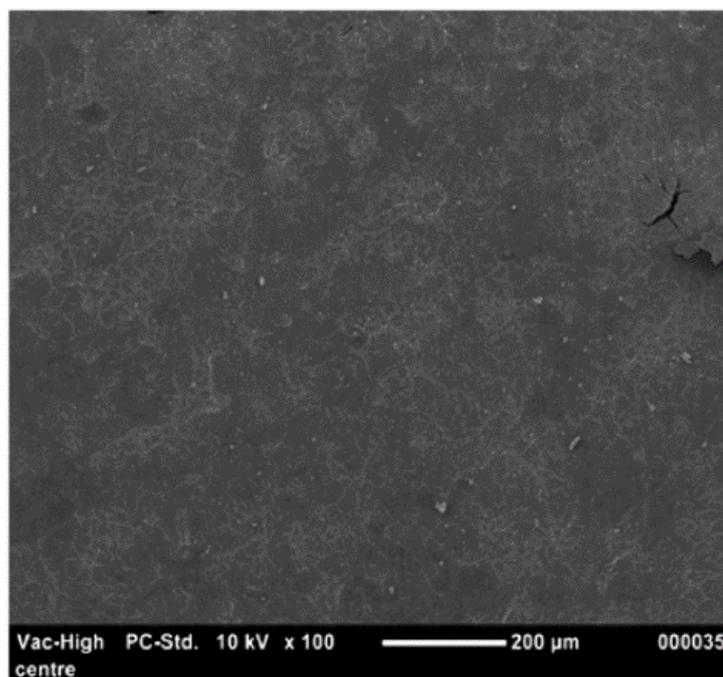
**Figura 17. Microfotografía de cáscara de huevo (x100) (escala: 100 µm).** **Figura 18. Detalle de la microestructura de la cáscara de huevo (x5000) (escala: 5 µm)**

El huevo está protegido contra la contaminación bacteriana por la cáscara y las membranas testáceas, que actúan juntos como una barrera física eficaz contra la penetración bacteriana (Board & Tranter, 1995; De Reu et al., 2006; Jonchere et al., 2010). La cáscara está atravesada por numerosos poros que forman túneles entre los cristales minerales y permiten el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior. Su número varía entre 7 000 y 15 000. Son especialmente numerosos en la zona del polo ancho del huevo, donde aparece la cámara de aire. Pero estos poros también posibilitan la penetración microbiana y la contaminación del contenido de huevo (Hincke et al., 2012). La cutícula, una capa muy fina (hasta 12 µm) proteica que cubre la superficie del cascarón y obtura los poros limitando así el movimiento de las partículas, agua y bacterias a través de la cáscara (Junta & Salas, 1973; Junta & Tranter, 1995; De Reu et al., 2006). De hecho, los huevos con una cutícula ausente o parcialmente eliminada son más susceptibles a la contaminación bacteriana (Bain et al., 2013; Junta & Salas, 1973; De Reu et al., 2006; Messens et al., 2005; Chispas & Tablero, 1984).

Si se observan las imágenes puede apreciarse que en la Figura 17 se ve un poro en el centro de la imagen y algunos vestigios de cutícula cubriendo la cáscara. En la Figura 18 se observa otra zona de la cáscara a más aumento en la que casi no queda cutícula y quedan al descubierto muchos más poros. Algunos de estos poros presentan un tamaño aproximado de  $1\mu\text{m}$  pudiendo ser, por tanto, atravesados por las bacterias.

Un estudio reciente ha demostrado que la cutícula es más efectiva entre las 6 y 72 horas después de la puesta (Muñoz et al., 2015). Además, también depende de la composición química, la humedad, el pH, la temperatura y los tratamientos a los que hayan sido sometidos (Rendueles, 2016).

Comparando estas imágenes con las de trabajos en los que han estudiado los huevos recién puestos cuando todavía tienen la cutícula intacta (Samiullah et al., 2013) puede apreciarse claramente la diferencia, siendo los poros mucho menos apreciables en este caso (ver Figura 19).



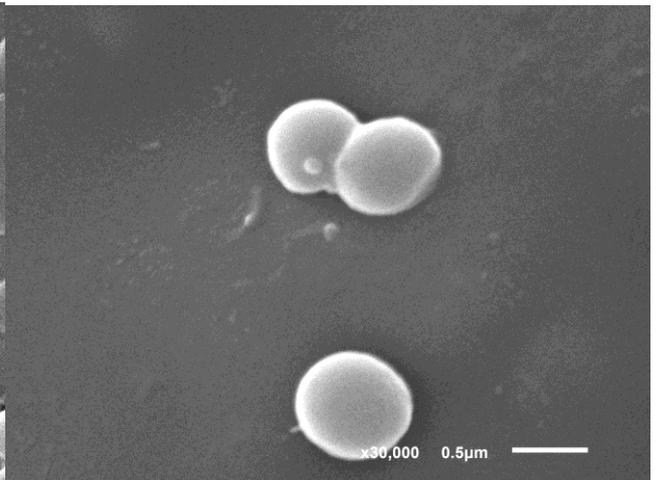
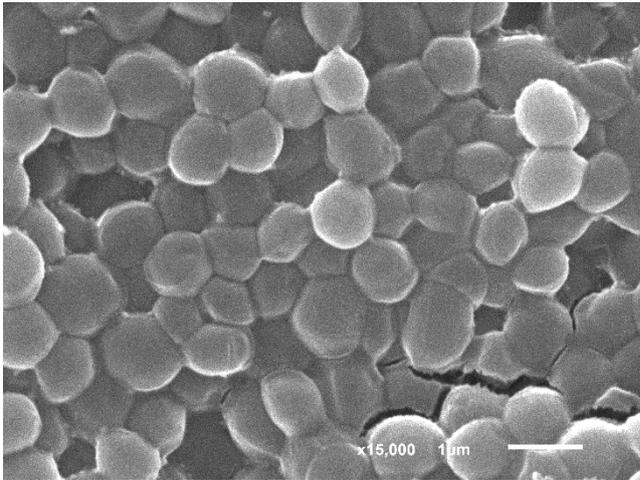
**Figura 17. Imagen SEM cutícula intacta (Samiullah et al.,2013)**

Estas diferencias pueden deberse a que los huevos adquiridos en un supermercado no llegan al consumidor entre las 6 y las 72 horas de la puesta, tiempo que tenían los huevos analizados por Samiullah et al.. Además, sufren una manipulación que puede hacer que la cutícula se rompa y vaya desapareciendo. Para su puesta en venta los huevos pueden

ser limpiados por vía húmeda o seca. La primera suele hacerse con agua en ducha a unos 10°C por encima de la temperatura del huevo y al agua puede añadirse entre unas 20 y 100 ppm de Cloro como desinfectante. En la limpieza en seco los huevos pasan por cintas transportadoras en las que se van cepillando suavemente (Rendueles, 2016). Tanto un tratamiento como el otro pueden degradar la cutícula perdiendo así su efecto protector.

Respecto al comportamiento de los microorganismos en la cáscara de huevo y tomando como modelo *S. warneri*, se muestran en las Figuras 20 y 21 los fragmentos de cáscara de huevo que habían sido inoculados tanto con una suspensión de medio de cultivo de 2 µL, como en los que se había extendido una colonia directamente con un asa de siembra.

Se puede apreciar como en los fragmentos inoculados con una gota de medio inoculado *S. warneri* forma un biofilm en la superficie y se puede ver la morfología típica de crecimiento en racimo de uvas de un estafilococo. En el otro fragmento se observa la morfología individual de cada célula, típica de un coco, así como su tamaño de aproximadamente 1 µm (Caso, 2015).



**Figura 19.** Microfotografía de cáscara inoculada con 2 µL de cultivo líquido de *S. warneri* ( $\sim 10^7$  ufc/mL) (x15000) (escala: 1 µm). **Figura 18.** Microfotografía de cáscara inoculada con asa de siembra (x30000) (escala: 0.5 µm).

En la Figura 22 se muestra un fragmento de cáscara que fueron mantenidos en inmersión durante toda la noche en medio líquido. En esta imagen no sólo se observa cómo los *Staphylococcus* quedan pegados a la cáscara si no que, se ve perfectamente cómo crecen en el interior de un poro de unos 5µm de diámetro

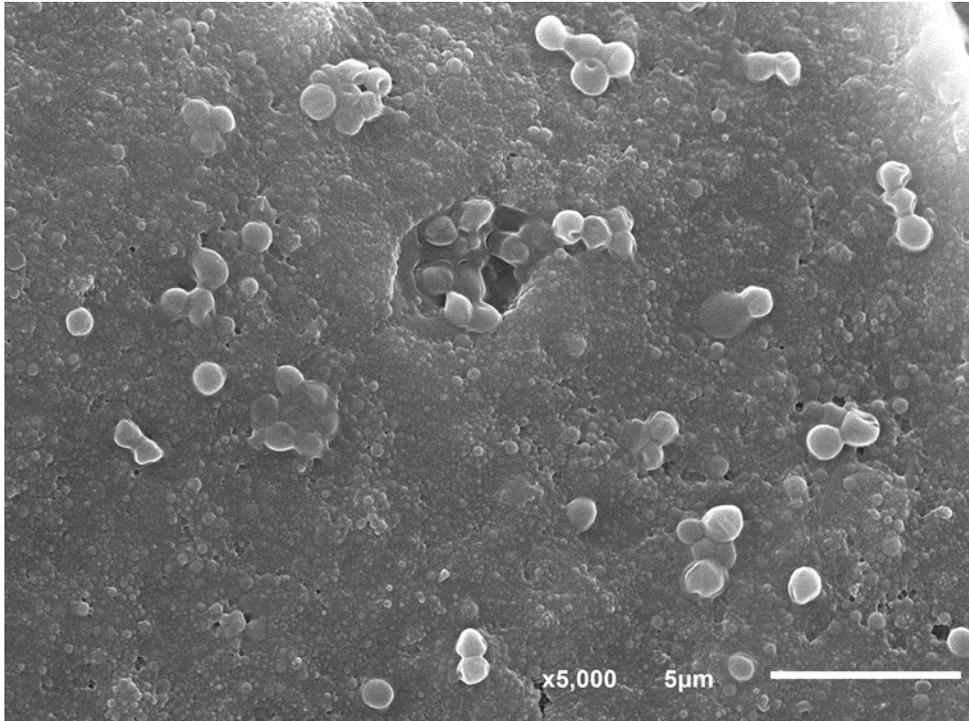
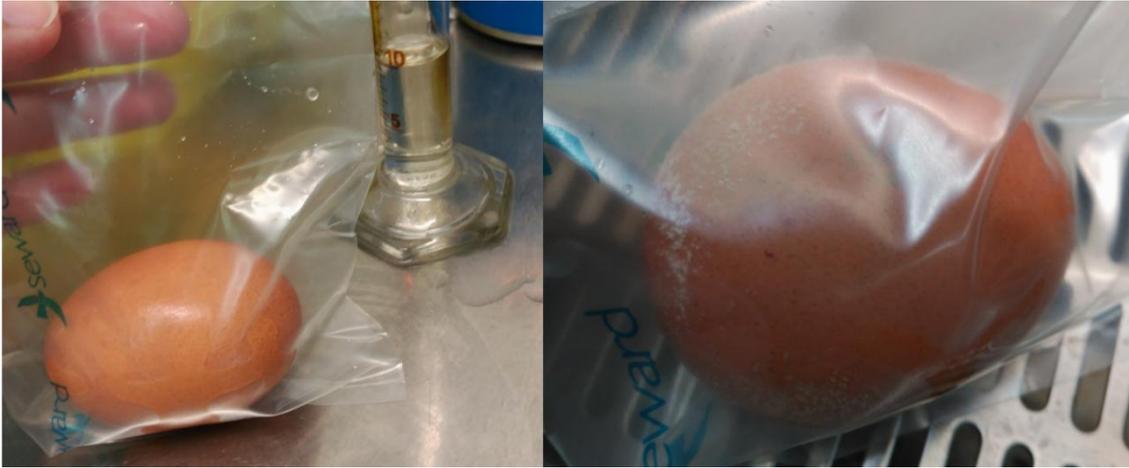


Figura 20. Imagen SEM fragmento de cáscara inoculado (x5000) (escala: 5µm)

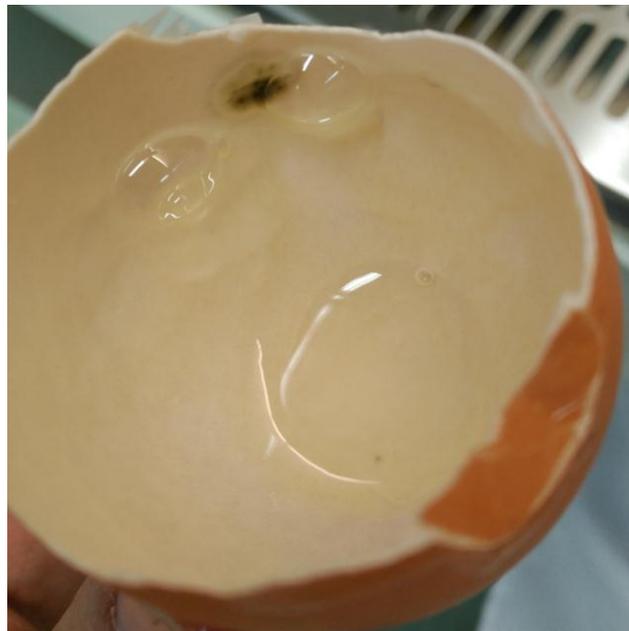
#### 4.2.1.1 Transporte de microorganismos a través de la cáscara: influencia del tiempo

##### a) Huevos sin inocular

Tal y como se muestra en la Figura 23, la apariencia externa del huevo en los analizados al 2º día era normal, sin embargo, en los analizados el 16º día se apreciaban en el exterior mohos, que, en algunos de los casos, incluso se habían fijado en la cara interna de la cáscara (Figura 24).



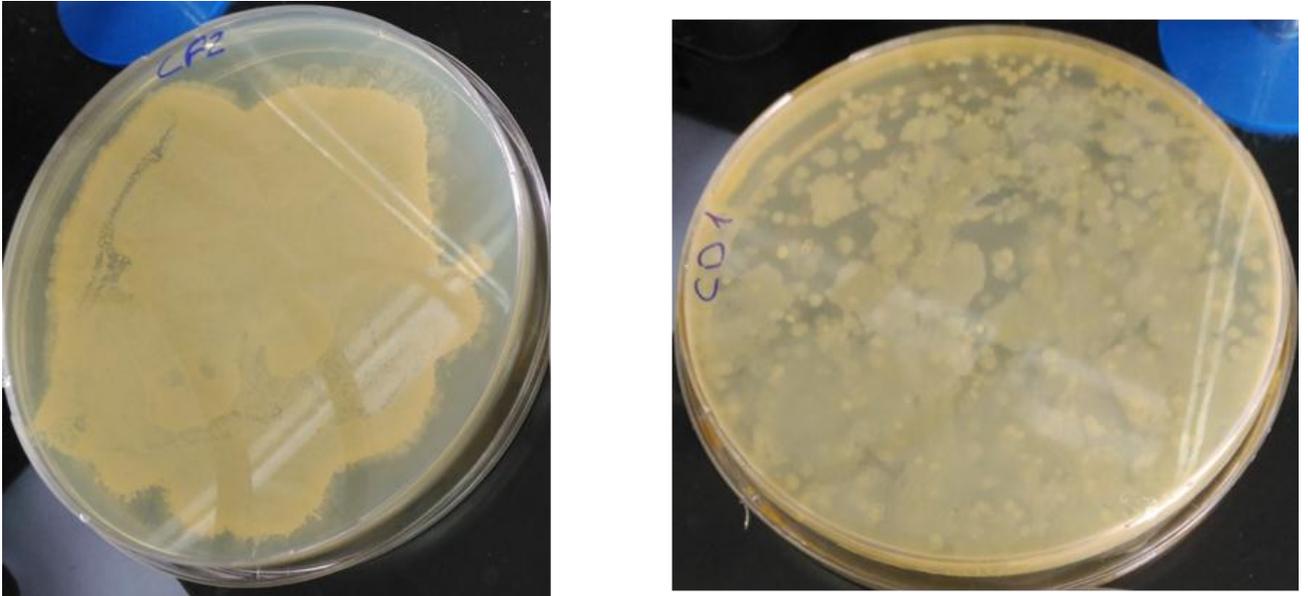
**Figura 21. Fotografías de un huevo al 2º día (izquierda) y al 16º.**



**Figura 22. Interior de la cascara de huevo analizado el 16º día**

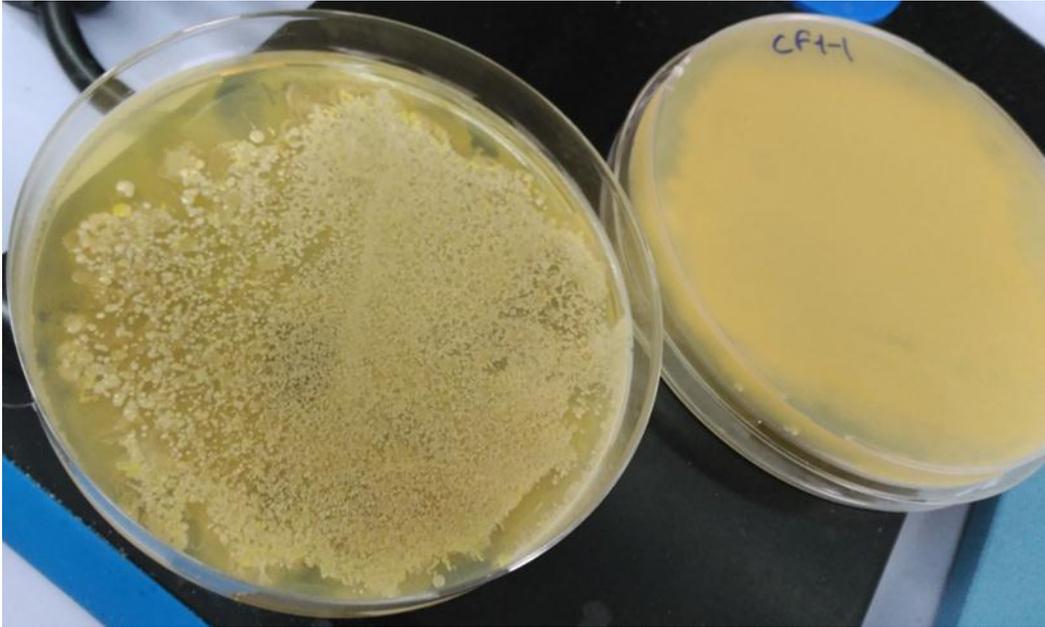
Se pone así de manifiesto que ambientes húmedos pueden desarrollarse mohos en la superficie, cuyo micelio puede hidrolizar la cutícula (si todavía quedan vestigios) y penetrar la cáscara (Caso, 2015). Por esta razón, es preferible que el embalaje de los huevos sea de cartón para que contribuya a eliminar la humedad. Se observa también que es imprescindible extremar la limpieza en los lugares de la puesta, así como evitar su posterior manipulación todo lo que sea posible. De esta manera, se pone de manifiesto como ya ha sido comentado en algunos estudios previos (Samiullah, 2013), que el lavado de los huevos favorece su posterior contaminación si no van a ser consumidos en ese mismo momento.

Esta presencia de mohos y microorganismos en los huevos se observa también en los recuentos en placa realizados tanto del exterior como del contenido interior (Figura 25).

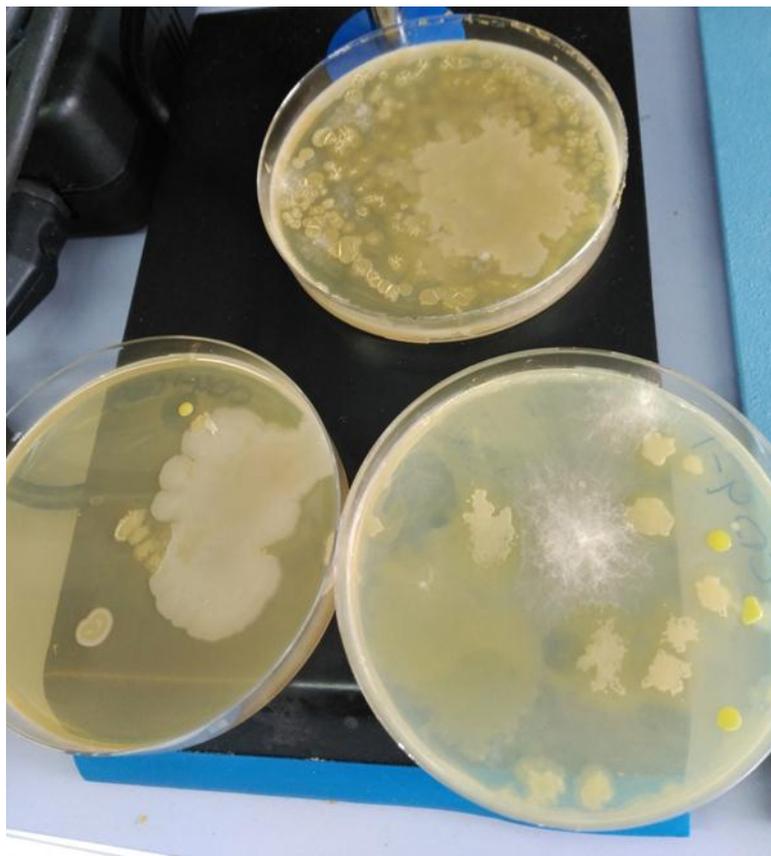


**Figura 23. Crecimiento en placa del exterior (izquierda) y del interior de la cáscara al 2º día.**

Se puede observar también que el crecimiento tanto de bacterias como de mohos es mayor en los analizados a los 16 días (Figuras 26 y 27).



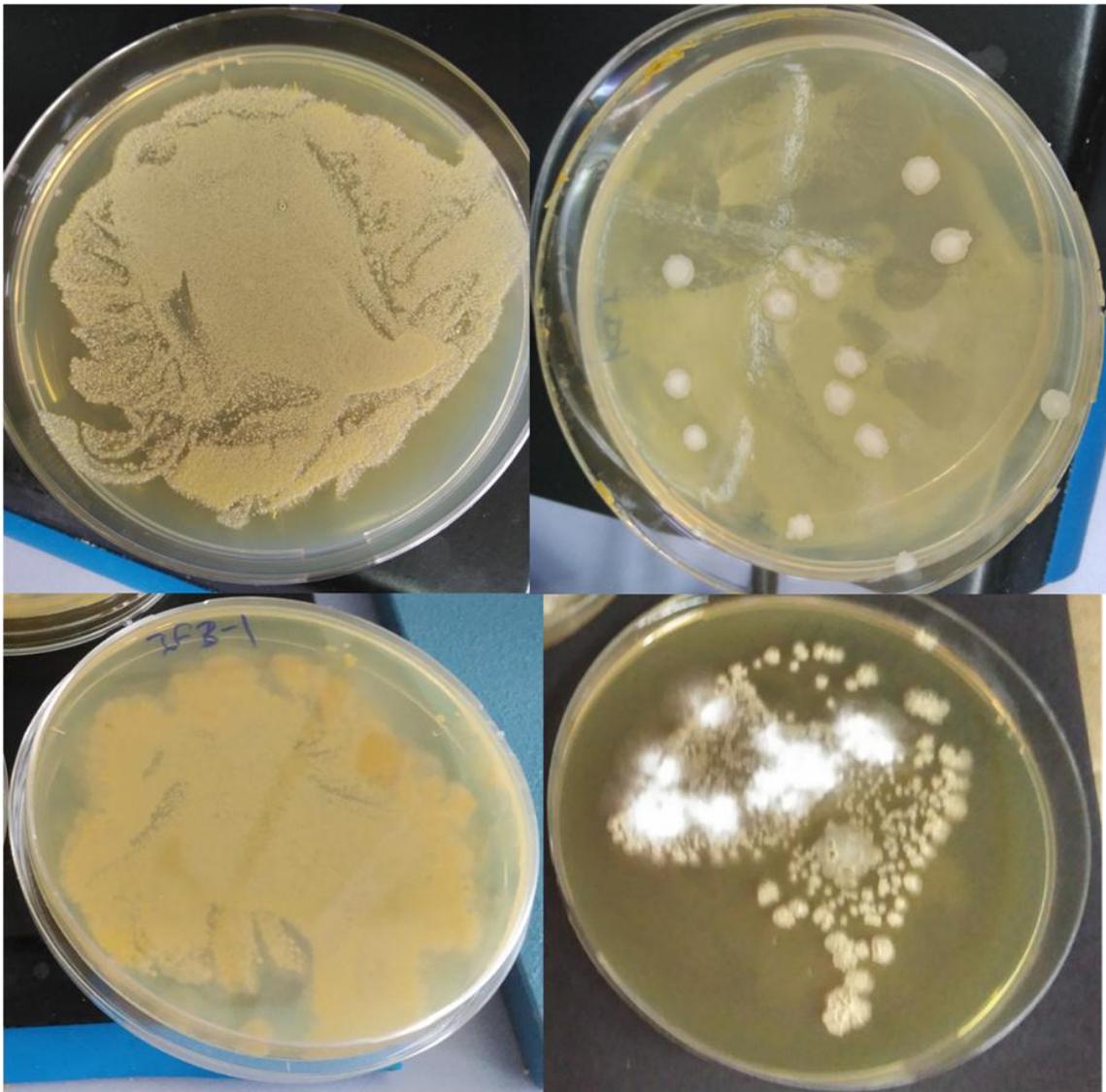
**Figura24. Crecimiento en placa del exterior del huevo a los 16 días.**



**Figura 25. Crecimiento en placa del interior del huevo a los 16 días.**

b) Huevos inoculados

En los huevos que habían sido sumergidos en el medio inoculado se observa unos resultados similares a los obtenidos en el medio sin inocular. Es decir, hay mayor crecimiento de mohos y bacterias tanto en el interior como en el exterior del huevo a los 16 días. Pero además de la microbiota de la cáscara se aprecia como también ha atravesado la cáscara *S. warneri*. Estas diferencias pueden apreciarse en la Figura 28.



**Figura 26.** En parte de arriba: exterior e interior de un huevo inoculado al 2º día. En la parte de abajo: exterior e interior de un huevo inoculado al 16º día.

Por tanto, se puede concluir que en diferentes condiciones los microorganismos no sólo se adhieren fácilmente sobre la superficie del huevo, sino que además se multiplican llegando incluso a formar capas continuas. Representando un peligro potencial de contaminación del huevo.

## 4.2.2 Desarrollo de *S. warneri* en distintos sustratos

### 4.2.2.1 Medio sintético

Para estudiar cómo se comporta *S. warneri* en condiciones óptimas se estudió su comportamiento en Nutrient Broth, en aerobiosis y a 37 °C. Con este ensayo se obtuvo la curva de crecimiento bacteriana mostrada en la Figura 29:

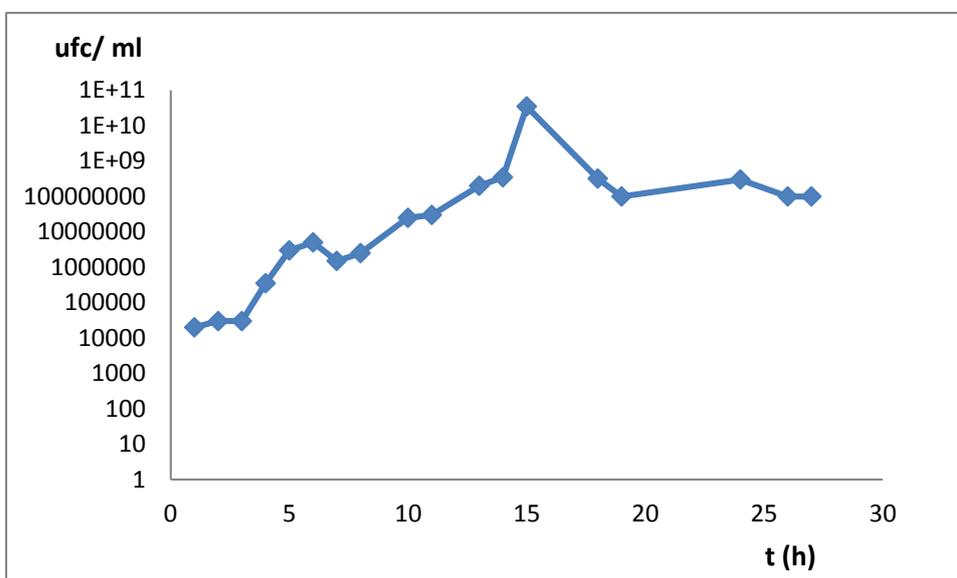


Figura 27. Curva de crecimiento en Nutrient Broth.

Cuando una población bacteriana es inoculada en un medio fresco el crecimiento no suele comenzar de inmediato, sino después de un tiempo llamado latencia. La fase de latencia, o fase lag, representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a unas nuevas condiciones. En esta fase no hay incremento del número de células, sin embargo, hay una gran actividad metabólica de las bacterias para adaptarse así a las condiciones de cultivo. En la gráfica se observa claramente como para *S. warneri* inoculada en Nutrient Broth la fase de latencia tienen una duración de unas 3 horas.

Entre las 4 y las 15 horas se observa la fase de crecimiento exponencial o logarítmico. Es el periodo de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece

exponencialmente, es decir, cada vez que pasa un cierto tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones adecuadas la velocidad de crecimiento es máxima.

Entre el tiempo 15 y 27 se observa la fase de crecimiento estacionaria. En cultivos discontinuos con condiciones limitantes una población no puede crecer indefinidamente de forma exponencial. Las limitaciones de crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por combinación de las causas anteriores.

Si la incubación continua, después de que una población alcanza la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y seguir metabolizando durante un cierto tiempo, pero finalmente comenzará una disminución progresiva en el número de células viables, y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte celular.

#### **4.2.2.2 Ovoproductos líquidos.**

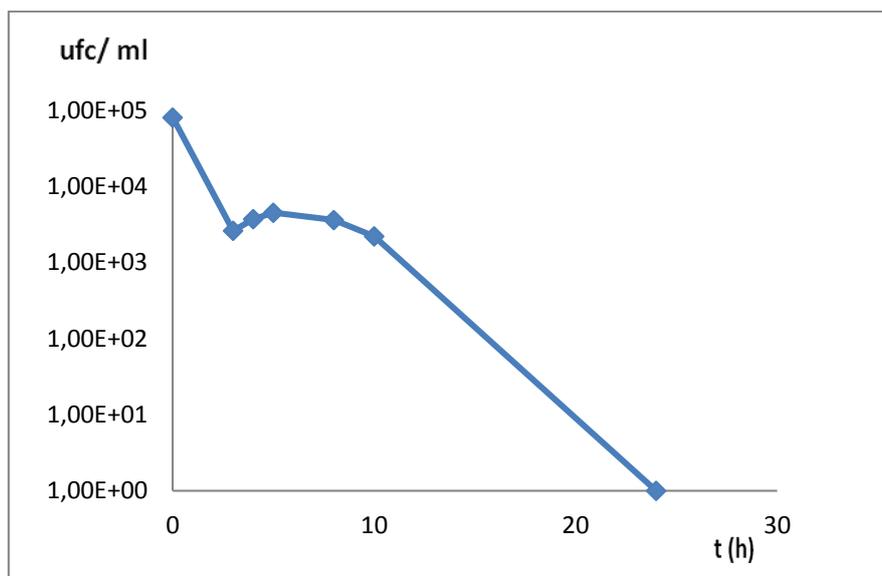
##### **a) Clara de huevo**

Con una concentración inicial de  $8 \times 10^4$  ufc/ml y en las condiciones óptimas de agitación y temperatura de *S. warneri*, se puede observar en la Figura 30 una disminución de más de un orden de magnitud de las ufc en las 3 primeras horas, este valor se mantiene más o menos constante hasta las 5 horas y posteriormente comienza a disminuir lentamente. Estos resultados vienen a corroborar las propiedades antimicrobianas de la clara descritas en la bibliografía:

- La lisozima es un enzima que degrada la pared celular bacteriana, hidrolizando las uniones  $\beta$  (1-4) entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina que constituyen el esqueleto del peptidoglicano. Además, tiene carácter electropositivo y puede aglutinar a las bacterias que presentan carga eléctrica negativa en su superficie. En concreto, Paramithiotis et al. (2006), estudiaron el efecto inhibitorio de la lisozima sobre diferentes especies de *Staphylococcus* y encontraron que, aunque el efecto de la lisozima depende del pH del medio, en todos los casos el número de ufc/ml de *S. warneri* decrece en el medio con lisozima.
- La conalbúmina, es una glucoproteína cuya fracción proteica es análoga a la transferrina e impide el desarrollo de los microorganismos gracias a su poder

quelante, principalmente de iones de hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Este tipo de inhibición depende también del microorganismo, por ejemplo, los micrococos son más sensibles que los bacilos (clase a la que pertenece los grampositivos *Staphylococcus*) pero éste lo es más que cualquier bacteria Gram negativa.

- Existen otras dos proteínas en la clara que tienen una acción análoga, aunque en este caso secuestran vitaminas en vez de hierro: la avidina se une a la biotina (vitamina H) y la flavoproteína se une a la riboflavina (vitamina B<sub>12</sub>). Estas dos vitaminas, que son factores de crecimiento indispensables para algunos microorganismos, no están disponibles en la clara de huevo.
- Por último, existe en la clara de huevo un conjunto de moléculas de naturaleza proteica que son inhibidoras de numerosas proteasas microbianas. Las principales son la ovostatina, la cistatina, el ovomucoide y el ovoinhibidor) (Caso, 2015; Carrillo 2013).



**Figura 28. Curva de crecimiento en clara de huevo.**

### **b) Yema de huevo**

Dado que en la yema no existen las mismas sustancias antimicrobianas que en la clara y que su poder nutritivo es elevado, se llevaron a cabo varios experimentos para observar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *S. warneri*, tal y como se muestra en la Figura 31 se obtuvieron 3 curvas de crecimiento.

A 37 °C que es la temperatura óptima de crecimiento de *S. warneri* se ve cómo se anula la fase lag y aparece directamente una fase de crecimiento exponencial de la bacteria durante las primeras 27 horas. Esto puede deberse a que, además de estar a su temperatura óptima, la concentración de nutrientes en el medio de cultivo (10 mL de yema y 90 mL de agua) es elevada y por esta razón puede ocurrir que la bacteria no haya necesitado adaptarse ni a la temperatura ni a niveles bajos de nutrientes, y su maquinaria celular se haya puesto a trabajar de inmediato. Después de esta fase de crecimiento exponencial, tiene lugar la fase estacionaria que dura entre las 27 y las 45 horas. A partir de este tiempo, las bacterias empiezan a entrar en muerte celular descendiendo la concentración de bacterias viables en el medio debido probablemente al agotamiento de nutrientes en el medio.

Con el experimento a 25 °C se pretende simular la temperatura ambiente que puede haber en una cocina de un restaurante en pleno servicio, o en un hogar en verano o incluso con calefacción. Se ve como *S. warneri* sí presenta en esta ocasión una fase de latencia o lag con una duración de unas 10 horas, este tiempo es probablemente el que necesita la bacteria para adaptarse a una temperatura que está 12 °C por debajo de su óptima. En el tiempo 10 empieza la fase de crecimiento exponencial que en este caso sólo dura 6 horas, hasta el tiempo 16, entrando así en la fase estacionaria. Esta fase estacionaria es mucho más larga (35 horas) que a 37 °C, al contrario de lo que pasa con la fase de crecimiento exponencial. A partir de las 51 horas el cultivo ya entra en la fase de muerte bacteriana, similar al tiempo 45 de la temperatura de 37°C. Es decir, aunque las fases lag y estacionaria no duran lo mismo, “globalmente” duran más o menos igual. En la gráfica se observa una concentración mayor a 25 °C que a 37° C pero es debido al inóculo inicial.

En el experimento realizado a 11 °C que simula el almacenamiento de ovoproductos en un almacén fresco se observa que la concentración de *S. warneri* se mantiene prácticamente constante a lo largo de las 73 horas. Podría decirse que es una fase lag permanente en la que el microorganismo intenta adaptarse a las condiciones adversas de temperatura ya que se encuentra 26 °C por debajo de su temperatura óptima. Las bacterias que han sido inoculadas vivas nunca llegan a adaptarse a esta temperatura de modo que

no tiene lugar en ningún momento la fase de crecimiento exponencial, por ello, el medio tarda más en agotarse, aunque cabe esperar que transcurridas varias horas las bacterias comenzarían la fase de muerte celular.

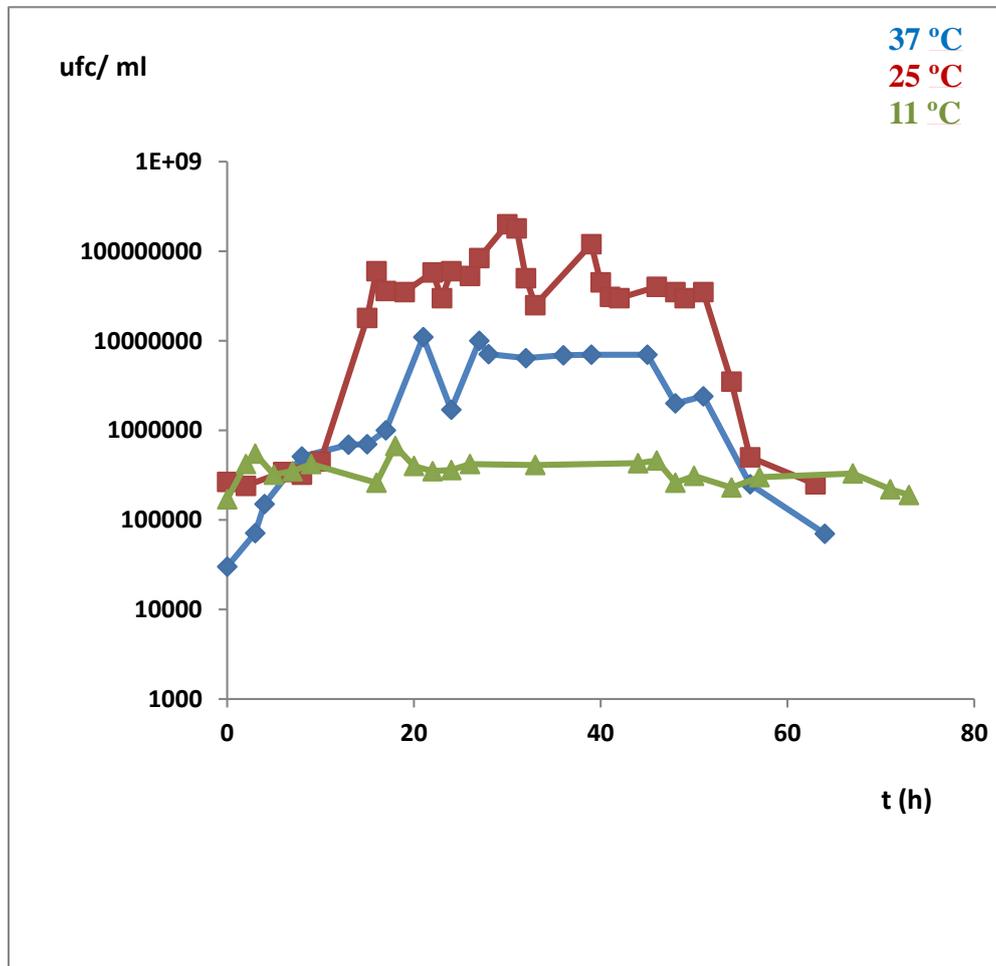


Figura 29. Crecimiento en yema de huevo

Figura 30. Crecimiento en yema de huevo

Además de analizar los cambios en el crecimiento celular de las bacterias a diferentes temperaturas gráficamente, se pueden emplear los datos correspondientes a la fase de crecimiento exponencial para realizar un ajuste a una ecuación de primer orden:  $r_x = dX/dt = \mu X$ ; siendo  $\mu$  el coeficiente de crecimiento exponencial y  $X$  la concentración bacteriana en cada tiempo.

Este tipo de crecimiento se denomina balanceado o equilibrado. Se caracteriza por ser el crecimiento en el que todos los constituyentes celulares se duplican en un mismo tiempo,

o, dicho de otra manera, en el que estos constituyentes aumentan proporcionalmente con un mismo factor en la unidad de tiempo. Este factor es el coeficiente de crecimiento exponencial ( $\mu$ ).

En el caso del experimento a 37 °C al no apreciarse una fase lag clara, se han ajustado todos los datos considerados anteriormente como fase exponencial (entre las 0 y las 27 horas) para el cálculo del coeficiente, obteniéndose un valor de 11,1 h<sup>-1</sup>. Para el estudio del crecimiento a 25 °C no se ha ajustado la fase lag, sólo lo considerado como fase de crecimiento exponencial (entre las 10 y las 16 horas) obteniendo un  $\mu$  2,9 h<sup>-1</sup>.

En el caso del experimento a 11 °C no se ha realizado el cálculo de  $\mu$  ya que el cultivo se ha mantenido durante todo el tiempo en valores más o menos constantes de concentración microbiana, de modo que no se observa ninguna fase de crecimiento exponencial.

El coeficiente exponencial de crecimiento ( $\mu$ ), que es característico para cada cepa bacteriana cultivada en un medio determinado y en unas condiciones concretas, demuestra, por tanto, que, tal y como resulta esperable y siendo *S. warneri* un microorganismo mesófilo, a menor temperatura, menor crecimiento bacteriano. Concretamente, la cepa empleada como modelo se multiplica más de 3 veces más rápido a 37 °C que a 25 °C en yema de huevo.

Podemos afirmar también que a temperatura ambiente el *S. warneri* se multiplica, no haciendo falta que esté a 37 °C. Además, a temperaturas frías, aunque no se multiplica se mantiene viable durante varias horas.

En un trabajo anterior (dos Santos, 2007) en el que estudian el comportamiento cinético de microorganismos de interés en la seguridad alimentaria se estudia el coeficiente de crecimiento exponencial para *S. aureus*, obteniendo unos  $\mu$  con un rango entre 0,1 y 0,3 h<sup>-1</sup>, con valores de temperatura entre los 26 y los 38 °C. Estos valores resultan mucho más bajos que los obtenidos en este trabajo, debido seguramente a que la especie no es la misma (como hemos dicho,  $\mu$  varía incluso entre cepas de la misma especie), a que el huevo puede ser más nutritivo que el medio BHI, y que también se tendría que considerar las condiciones de pH. Este autor también describe un incremento de los valores de  $\mu$  con el incremento de la temperatura, y, por tanto, la velocidad de crecimiento exponencial, de igual modo que los resultados obtenidos en el presente trabajo.

### 4.2.2.3 Ovoproductos sólidos

Una vez realizadas las tortillas, se procedió a su análisis. De cada tortilla se analizó 1g de la zona que simulaba el centro de la tortilla y, por lo tanto, la zona anaerobia de la tortilla (sin O<sub>2</sub>), y 1g de la zona superficial y, por tanto, aerobia de la tortilla (con O<sub>2</sub>).

**Tabla 6. Resultados de las medias de los recuentos en placa de las tortillas**

<b>Recién hecha</b>	<b>ufc/mL</b>	<b>24 horas</b>	<b>ufc/mL</b>
<b>Sin O<sub>2</sub></b>	2,1x10 <sup>7</sup>	<b>Sin O<sub>2</sub></b>	5x10 <sup>7</sup>
<b>Con O<sub>2</sub></b>	2,3x10 <sup>7</sup>	<b>Con O<sub>2</sub></b>	4,3x10 <sup>7</sup>

Teniendo en cuenta que en el preparado de tortilla había una concentración de inóculo inicial de 7,2x10<sup>6</sup> ufc/g, puede observarse en la Tabla 6 que en las tortillas analizadas recién hechas aumenta la concentración bacteriana. Esto puede ser debido a que el tiempo de preparación de la tortilla ya inoculada duró aproximadamente 1 hora.

En las que han sido analizadas a las 24 horas se ve que el inóculo ha continuado creciendo, llegando durante las 24 horas a aumentar un orden de magnitud. Sin embargo, no se observó ninguna limitación debida al transporte de oxígeno a través del medio. Así todo, *S. warneri* es un microorganismo anaerobio facultativo por lo que podría crecer también en casos de anoxia aunque sus condiciones ideales sean en ambiente aeróbico.

Lo que sí queda claro es que la temperatura a la que la se ha “cocinado” y el tiempo (8 minutos a 60 °C) no afecta a la concentración de microorganismos inoculada.

Estos resultados reafirman las indicaciones de las Guías de buenas prácticas de higiene y de implantación de APPCC reguladas por el Reglamento (CE) n° 852/2004 en las que se afirma que, para productos cocinados con huevo fresco, deben alcanzar la temperatura mínima de 75°C en el corazón del producto durante un mínimo de 5 minutos (AECOSAN, 2016).

También queda patente que en un alimento hecho a partir de huevo batido no se puede observar el efecto inhibitor de las sustancias antimicrobianas de la clara, posiblemente debido a la pequeña concentración en la que se encuentran.

## 5. Conclusiones

- 1- Los huevos comerciales muestran una gran variedad de microbiota en la cáscara, siendo destacable que esta biodiversidad fue mayor en huevos camperos que en huevos procedentes de gallinas enjauladas.
- 2- El género *Salmonella* no aparece en ninguna de las muestras de huevos estudiadas. Pudiendo deberse este hecho a la campaña de erradicación de este patógeno en las granjas avícolas puesta en marcha en 2004 por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- 3- Respecto al transporte a través de la cáscara, se observó que los microorganismos tienden a adherirse a la superficie del huevo, pudiendo atravesar con relativa facilidad las barreras protectoras naturales presentes en el mismo y multiplicándose así en el interior del huevo.
- 4- El cultivo de la bacteria modelo en la clara líquida mostró una disminución de más de un orden de magnitud de las unidades formadoras de colonias en las 3 primeras horas. Este valor se mantuvo más o menos constante hasta las 5 horas y posteriormente comenzó a disminuir lentamente. Estas observaciones están de acuerdo con las propiedades antimicrobianas de la clara de huevo descritas en la bibliografía.
- 5- En la yema, los microorganismos encuentran un medio rico en el que se multiplican rápidamente. Además, se observó que *S. warneri* incrementaba su número en todo el rango de temperaturas estudiadas (11°C, 25°C y 37°C), aunque a temperaturas más elevadas el microorganismo se multiplicaba más rápidamente.
- 6- En ovoproductos sólidos cocinados *S. warneri* se aclimató fácilmente al medio, aumentando su concentración aproximadamente un orden de magnitud a las 24 horas. Asimismo, no se observó ninguna limitación debida al transporte de oxígeno a través del medio.

## 6. Bibliografía

Dos Santos, A.G. (2007). Estudio del comportamiento cinético de los microorganismos de interés en la seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis.

Anton, M. (2007). Composition and structure of hen egg yolk. En: Huopalati, R. López-Fandiño, R., Anton, M. y Schade, R. (Eds). Bioactive egg compounds, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (Germany), pp. 1-6.

Baron, F.; Nau, F.; Guérin-Dubiard, C.; Bonnassie, S.; Gautier, M.; Andrews, S.C.; Jan, S. (2016). Egg white versus *Salmonella* Enteritidis. A harsh medium meets a resilient pathogen. Food Microbiology Part B 53: 82-93.

Caso, J.L. (2015) Alteraciones y enfermedades microbianas asociadas a los alimentos. Máster en Biotecnología Alimentaria.

Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) (2016): <http://www.icmsf.org/>

Cuevas, O.; Cercenado, E.; Goyanes, M.J.; Vindel, A.; Trincado, P.; Boquete, T.; Marín, M.; Bouza, E. (2008) *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006) Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 26: 269-277.

Curran-Celentano, J.M.; Wenzel, A; Nicolosi, R.J.; Handelman, G.J. (2003). Evaluating the influence of egg consumption as a source of macular carotenoids and the impact on serum cholesterol risk ratios. Investigative Ophthalmology & Visual Science 44: E-abstract: 403.

Chemaly, M.; Salvat, G. (2011) 2-Foodborne disease associated with eggs: microbial hazards and *Salmonella* Enteritidis risk assessment. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: 34-45.

De Reu, K.; Grijspeerd, K.; Messens, W.; Heyndrickx, M.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.; Herman, L. (2006) Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg

contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. International Journal of Food Microbiology 112: 253-260.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2016): <http://www.fao.org>

Gole, V.C.; Roberts, J.R.; Sexton, M.; May, D.; Kiermeier, A.; Chousalkar, K.K. (2014). Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various *Salmonella* strains. International Journal of Food Microbiology 182-183: 18-25.

Hennekinne, J.A.; Herbin, S.; Firmesse, O.; Auvray, F. (2015) European food poisoning outbreaks involving meat and meat-based products. Procedia Food Science 5: 93-96.

Howard, Z.R.; O'Bryan, C.A.; Crandall, P.G.; Ricke, S.C. (2012) *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. Food Research International 45: 755-764.

Huang, L. (2015) Direct construction of predictive models for describing growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid eggs - A one-step approach. Food Control 57: 76-81.

Hudson, J.A. (2014) Microbiological Safety of meat. *Staphylococcus aureus*. Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition): 376-381.

Laca, A.; Díaz, M. (2003) Seguridad alimentaria y desarrollo de patógenos I. Caracterización. Alimentación Equipos, y Tecnología 183: 88-93.

Lasagabaster, A.; Arbolea, J.C.; Martínez de Marañón, I. (2011) Pulsed light technology for surface decontamination of eggs: Impact on *Salmonella* inactivation and egg quality. Innovative Food Science & Emerging Technologies 12: 124-128.

Leleu, S.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; De Reu, K.; Michiels, C.W.; De Baerdemaeker, J.; Messens, W. (2011) Effects on *Salmonella* shell contamination and trans-shell penetration of coating hens' eggs with chitosan. International Journal of Food Microbiology 145: 43-48.

Lyle BJ, Mares-Perlman JA, Klein B, Klein R, Greger J. 1999. Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the Beaver Dam Eye Study. Am J Epidemiol 149:801-9.

MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2016): <http://www.magrama.es>

Moeller, S.M.; Jacques, P.F.; Blumberg, J.B. (2000). The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *The Journal of the American College of Nutrition* 19:522S-527S.

Møller, C.O.A.; Ilg, Y.; Aabo, S.; Christensen, B.B.; Dalgaard, P.; Hansen, T.B. (2013) Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella* spp. in fresh pork - A predictive microbiology approach. *Food Microbiology* 34: 284-295.

Mossel D.A.A (1985). Introduction and prospective. *International Journal of Food Microbiology* 2: 1-7.

Muñoz, A.; Dominguez-Gasca, N.; Jimenez-Lopez, C.; Rodriguez-Navarro, A.B. (2015). Importance of eggshell cuticle composition and maturity for avoiding transshell *Salmonella* contamination in chicken eggs. *Food Control* 55: 31-38.

Noriega, E. (2005). Seguridad alimentaria: análisis y modelización del crecimiento de microorganismos. Universidad de Oviedo. Trabajo de Investigación.

O'Flaherty, S.; Klaenhammer, T. (2011). The impact of omic technologies on the study of food microbes. *Annual Reviews of Food Science and Technology* 2: 353-371.

OMS. Organización Mundial de la Salud (2016): <http://www.who.int/>

Park, S.; Choi, S.; Kim, H.; Kim, Y.; Kim, B.; Beuchat, L.R.; Ryu, J.H. (2015) Fate of mesophilic aerobic bacteria and *Salmonella enterica* on the surface of eggs as affected by chicken feces, storage temperature, and relative humidity. *Food Microbiology* 48: 200-205.

PCR. Patología Rehabilitación y Construcción (2016) <http://www.patologiasconstruccion.net/>

Perez-Rodriguez, F.; Begum, M.; Johannesse, G.S. (2014) Study of the crosscontamination and survival of *Salmonella* in fresh apples. *International Journal of Food Microbiology* 184: 92-97.

Perry, J.J.; Yousef, A.E. (2012). Chapter Seven - *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: evolving concerns and innovative control measures. *Advances in Applied Microbiology* 81: 243-274.

Raspoet, R.; Gantois, I.; Devloo, R.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. (2011) 3 - Internal contamination of eggs by *Salmonella* Enteritidis. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*: 46-61.

Réhault-Godbert, S.; Hervé-Grépinet, V.; Gautron, J.; Cabau, C.; Nys, Y.; Hincke, M. (2011) 9 - Molecules involved in chemical defence of the chicken egg. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*: 183-208.

Rendueles, M. (2016) Industrias cárnicas, de pescado y del huevo. *Industrias Alimentarias. Máster en Biotecnología Alimentaria*.

Ricke, S.C.; Gast R.K. (2014). *Salmonella*. *Salmonella* Enteritidis. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*: 343-348.

Rodicio, M.R. (2016). Genómica y Metagenómica. *Aplicaciones en Biotecnología y Seguridad Alimentaria. Máster en Biotecnología Alimentaria*.

Samiullah; Chousalkar, K.K.; Roberts, J.R.; Sexton, M.; May, D.; Kiermeier, A. (2013). Effects of egg shell quality and washing on *Salmonella* Infantis penetration. *International Journal of Food Microbiology* 165: 77-83.

Stepień-Pyśniak, D.; Marek, A.; Rzedzicki, J. (2009). Occurrence of bacteria of the genus *Staphylococcus* in table eggs descended from different sources. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 12: 481-484.

Theron, H.; Venter, P.; Lues, J.F.R. (2003). Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. *Food Research International* 36: 969-975.

Universidad de Navarra (2016): <http://www.unavarra.es/>

Stadelman, W.J.; Gison, V.M.O.; Shemwell, G.A.; Pasch. S. (1990). *Egg and Poultry Meat: Processing*, Editorial VCR.

Carrillo, W. (2013) Lysozyme: Antibacterial Activity and Allergenicity. Instituto de Investigacion en Ciencias de la Alimentacion (CIAL-CSIC-UAM) Madrid- España. Actualización en Nutrición Vol 14 - Nº 4.

Zeidler, G. (2002) Further-processing of Egg and Egg Products en “Commercial Chicken Meat and Egg Production” D. D. Bell y W. D. Weaver (Eds.) Springer Science & Business Media, pp. 1163-1198.