



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO EN HUEVOS DESECHADOS DE  
INCUBACIÓN NATURAL EN SEMI CAUTIVERIO DE  
*Rhea pennata* EN EL CENTRO DE RESCATE DEL PELT, 2018**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. CARLOS ALBERTO PEREZ ACUÑA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO - PERÚ**

**2021**



## DEDICATORIA

*Gracias a Dios por guiar  
mi camino y por  
permitirme llegar hasta  
este momento tan  
importante y lograr una  
meta más en mi vida.*

*Con inmenso cariño y  
gratitud a mis padres  
FELIX y RUTH, por su  
sacrificio y por haberme  
apoyado en mis estudios y  
culminación de mi carrera  
profesional.*

*Al amor de mi vida  
GRASSI, que ha estado a  
mi lado dándome cariño,  
confianza y apoyo  
incondicional para seguir  
adelante y cumplir esta  
etapa en mi vida.*

*A mis queridos hijos  
NÍCOLAS y JOSUE por su  
paciencia y por ser el  
motivo y la razón que me  
ha llevado a seguir  
superándome día a día,  
para alcanzar mis más  
apreciados ideales de  
superación.*



## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento profundo y sincero.

- A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas que durante 5 años contribuyeron con sus grandes enseñanzas en mi formación profesional.
- A mi director de tesis Dr. Juan José Pauro Roque por su amistad, confianza, colaboración y apoyo en la culminación del presente trabajo.
- A mis jurados de tesis, Mg. Gilmar Gamaliel Goyzueta Camacho, Mg. Alfredo Ludwing Loza del Carpio y Mg. Jesus Miranda Mamani, quienes con su apoyo y sus sabios consejos me brindaron lo necesario para la culminación de mi trabajo de investigación.
- Al Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca – PEBLT y al personal de trabajo del centro de rescate del suri por brindarme las facilidades para la obtención de muestras.
- A todas aquellas personas que contribuyeron con sus consejos, recomendaciones y sabias enseñanzas en el desarrollo del presente trabajo de investigación; ya que su apoyo fue muy importante para su culminación.
- A todos ellos muchas gracias.

Carlos Alberto Perez Acuña



## ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE GENERAL**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE TABLAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN** ..... 14

**ABSTRACT**..... 15

### **CAPÍTULO I**

#### **INTRODUCCION**

**1.1. OBJETIVO GENERAL:** ..... 17

**1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:** ..... 17

### **CAPÍTULO II**

#### **REVISIÓN DE LITERATURA**

**2.1. ANTECEDENTES:** ..... 19

**2.2. MARCO TEÓRICO:** ..... 28

2.2.1. Suri (*Rhea pennata*) ..... 28

2.2.2. Clasificación taxonómica ..... 28

2.2.3. Hábitat del suri ..... 29

2.2.4. Sistema reproductivo en la Hembra ..... 30

2.2.5. Conducta reproductiva ..... 30

2.2.6. Huevo ..... 32

2.2.7. Estructuras Internas del Huevo ..... 33

2.2.8. Calidad microbiológica del huevo..... 34

2.2.9. Bacterias aerobias mesófilos ..... 35

2.2.10. Aspectos generales sobre Recuento microorganismos Mesófilos..... 36



|   |    |
|---|----|
| 2.2.11. Vías que producen contaminación en el huevo ..... | 36 |
| 2.2.12. Bacterias .....                                   | 37 |
| 2.2.13. Forma y Tamaño Bacteriano .....                   | 37 |
| 2.2.14. Bacterias Grampositivas.....                      | 39 |
| 2.2.15. Bacterias Gramnegativas.....                      | 40 |
| 2.2.16. Aislamiento de Bacterias.....                     | 42 |
| 2.2.17. Medios de cultivo .....                           | 43 |
| 2.2.18. Estafilococos .....                               | 45 |
| 2.2.19. Bacilos Grampositivos .....                       | 46 |
| 2.2.20. Bacilos Gramnegativos .....                       | 47 |

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.1 ZONA DE ESTUDIO.....</b>                | <b>50</b> |
| <b>3.2 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN .....</b> | <b>51</b> |
| <b>3.3 METODOLOGÍA .....</b>                   | <b>51</b> |

### **CAPÍTULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.1 CARGA BACTERIANA PRESENTE EN DIFERENTES<br/>ESTRUCTURAS INTERNAS (MEMBRANA DE LA CÁSCARA,<br/>ALBÚMINA, VITELO, MEMBRANA CORIOALANTOÍDEA Y<br/>EMBRIÓN) DE HUEVOS DESECHADOS DE INCUBACIÓN<br/>NATURAL EN SEMI CAUTIVERIO DE <i>Rhea pennata</i>. .....</b>   | <b>65</b> |
| <b>4.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIAS PRESENTES<br/>EN DIFERENTES ESTRUCTURAS INTERNAS (MEMBRANA DE<br/>LA CASCARA, ALBÚMINA, VITELO, MEMBRANA<br/>CORIOALANTOÍDEA Y EMBRIÓN) DE HUEVOS DESECHADOS<br/>DURANTE EL PERIODO DE INCUBACIÓN NATURAL EN SEMI<br/>CAUTIVERIO DE <i>Rhea pennata</i>. .....</b> | <b>75</b> |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>85</b> |



|  |    |
|--|----|
| <b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....             | 86 |
| <b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> ..... | 87 |
| <b>ANEXOS</b> .....                          | 92 |

**Fecha de sustentación:** 19 de marzo 2021.

**Área** : Ciencias Biomédicas.

**Línea** : Calidad Ambiental.



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> El suri ( <i>Rhea pennata</i> ).....  | 29 |
| <b>Figura 2.</b> Indicadores de reproducción en el centro de rescate. (PELT, 2017).....  | 32 |
| <b>Figura 3.</b> Macho realizando la incubación y una hembra buscando dejar sus huevos. .  | 32 |
| <b>Figura 4.</b> Huevo de suri indicando sus partes. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). .....  | 33 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema del Huevo de Avestruz. (Carbajo et al 1997). .....  | 34 |
| <b>Figura 6.</b> (a) Partes internas del huevo con formación de embrión (b) Embrión de suri ( <i>Rhea pennata</i> ). Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero 2019). ..... | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Diferentes formas y Tamaños de bacterias.(Tortora et al.,2007).....   | 39 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema general de un corte transversal de una célula bacteriana. Lado izquierdo grampositiva, lado derecho gramnegativa (Murray et al., 2009). ..  | 42 |
| <b>Figura 9.</b> Mapa de ubicación de la zona de estudio (PELT, 2008).....   | 50 |
| <b>Figura 10.</b> Representación esquemática de la técnica (Mendo, 2003). .....  | 53 |
| <b>Figura 11.</b> Diluciones seriadas de la muestra y método de siembra en placa. (Madigan & Clark, 2009).....   | 54 |
| <b>Figura 12.</b> Carga bacteriana en estructuras internas de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de <i>Rhea pennata</i> . (agosto, 2020). ....   | 66 |
| <b>Figura 13.</b> Carga bacteriana en membrana corioalantoídea y embrión de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de <i>Rhea pennata</i> . (agosto 2020). .....   | 71 |
| <b>Figura 14.</b> Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en la membrana de la cascara de los huevos desechados de suri, Puno 2020.....  | 79 |
| <b>Figura 15.</b> Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en la albumina de los huevos desechados de suri, Puno 2020. ....   | 80 |
| <b>Figura 16.</b> Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en el vitelo de los huevos desechados de suri, Puno 2020.....  | 81 |
| <b>Figura 17.</b> Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en la membrana corioalantoídea de los huevos desechados de suri, Puno 2020.....  | 82 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 18.</b> Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en el embrión de los huevos desechados de suri, Puno 2020. ....  | 83  |
| <b>Figura 19.</b> Inoculación de las diluciones seriadas con tres repeticiones por cada parte del huevo (membrana interna, clara, yema, membrana corioalantoidea y embrión). Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). ....   | 97  |
| <b>Figura 20.</b> Selección de placas que contengan entre 30 y 300 colonias. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). ....   | 98  |
| <b>Figura 21.</b> Placas que mostraron más de 300 colonias se las dividió en secciones radiales convenientes (2,4,8) y se contó todas las colonias en una o más secciones. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). ....   | 98  |
| <b>Figura 22.</b> Medios de cultivo Agar EMB y Agar Sangre. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).. ....   | 99  |
| <b>Figura 23.</b> Crecimiento positivo (a) Agar EMB (b) Agar Sangre. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano (enero, 2019). ....  | 99  |
| <b>Figura 24.</b> Método de tinción Gram, realizado para cada uno de los cultivos. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). ....   | 100 |
| <b>Figura 25.</b> Aislamiento de microorganismos: parte superior crecimiento en agar EMB y en la parte inferior crecimiento en agar sangre. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano (enero, 2019). ....   | 100 |
| <b>Figura 26.</b> Imágenes capturadas a 100x (a) bacilos Gram (-) probable <i>Pseudomona</i> sp. (b) bacilos Gram (-) probable <i>Escherichia coli</i> . (c) bacilos Gram (+) probable <i>Bacillus</i> sp. (d) cocos Gram (+) probable <i>Staphylococcus aureus</i> . Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano.(enero, 2019). .... | 101 |
| <b>Figura 27.</b> Prueba de la oxidasa (a) selección de colonia (b) aplicación de la masa de la colonia en la tira reactiva (c) prueba para <i>Staphylococcus aureus</i> con   |     |



|  |     |
|--|-----|
| resultado negativo (d) prueba positiva para Pseudomonas sp. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).....   | 102 |
| <b>Figura 28.</b> Prueba de la catalasa (a) Bacillus (b) Estafilococcus. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). .....  | 102 |
| <b>Figura 29.</b> Prueba de la coagulasa (a) Zona rasurada de la vena marginal (b) extracción de sangre (c) plasma de conejo (d) prueba coagulasa-positiva para Staphylococcus aureus. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero,2019)..... | 103 |
| <b>Figura 30.</b> Prueba de TSI (a) medio sin inocular (b) prueba positiva cambio de color A/A Gas ++. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). .....  | 104 |
| <b>Figura 31.</b> Prueba de LIA (a) medio sin inocular (b) prueba negativa no cambia de color K/K. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). .....  | 104 |
| <b>Figura 32.</b> Prueba Citrato de Simons (a) medio sin inocular (b) prueba positiva, cambio de color. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019). .....   | 105 |
| <b>Figura 33.</b> Prueba indol (a) adición del reactivo de kovacs (b) reacción positiva del anillo rojo que indica producción de indol. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).. .....  | 105 |
| <b>Figura 34.</b> Prueba de SIM (a) adición de reactivo de Kovacs (b) reacción positiva a sulfuro de hidrogeno, positivo indol, positivo Movilidad. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019) .....                                  | 106 |
| <b>Figura 35.</b> Prueba de Urea (a) medio sin inocular (b) reacción positiva cambio de color. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).....  | 106 |
| <b>Figura 36.</b> Lugar de recolección de muestras: (a)centro poblado de Tupala (b) Modulo de rescate del suri Chapuco (c) Muestras de huevos de suri (d) Entrega de muestras de huevo de suri por parte del encargado del modulo Chapuco.(Enero, 2019). .....                                   | 107 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 37.</b> Materiales (a) Materiales esterilizados (b) placas dispuestas para plaque.  | 108 |
| <b>Figura 38.</b> Pasos del procesamiento de muestra (a) Muestra (b) Desinfección con povidona yodada (c) Piquete del huevo con estilete (d) Ruptura de la cascara con la ayuda de unas pinzas (e) Apertura completa del huevo (f) Vaciado de la albumina en un envase estéril (g) albumina (h) yema (i) vertido de 10 ml de yema (j) vertido 10ml de albumina (K) dilución de muestra $10^{-1}$ (l) Tubos dispuestos para realizar diluciones seriadas. .... | 110 |
| <b>Figura 39.</b> Preparaciones Agar sangre y Agar EMB (a) y (b) extracción de sangre de conejo (c) preparado de agar sangre (d) vertido en placas con agar sangre (e) medio EMB (f) placas con agar EMB y agar sangre.....   | 111 |
| <b>Figura 40.</b> Medios de cultivo que fueron pesados de diferentes medios de cultivo diferenciales de la marca HIMEDIA. ....  | 112 |
| <b>Figura 41.</b> Medios de cultivo preparados, nótese la diferencia de colores de derecha a izquierda que pertenecen al medio TSI, LIA, Citrato de Simmons, Agua trioptona, Manitol salado, SIM, Agar urea.....  | 112 |
| <b>Figura 42.</b> Tubos con medios en pico de flauta. ....  | 113 |
| <b>Figura 43.</b> Diagnostico bacteriológico de 84 huevos de choiques recibidos por el INTA Bariloche 2001. ....  | 113 |
| <b>Figura 44.</b> Mortalidad embrionaria en 37 huevos (42%) recibidos por el INTA Bariloche 2001. ....  | 114 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Huevos y ovoproductos .....   | 35 |
| <b>Tabla 2.</b> Carga bacteriana (UFC/ml) en membrana de la cáscara, albumina y vitelo de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de Rhea pennata. (agosto, 2020). .....   | 65 |
| <b>Tabla 3.</b> Análisis de varianza para carga bacteriana en membrana de la cáscara, albumina y vitelo de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de Rhea pennata. (agosto, 2020). .....  | 69 |
| <b>Tabla 4.</b> Prueba de rango múltiple de Duncan para carga bacteriana en membrana de la cáscara, albumina y vitelo de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de Rhea pennata. (agosto, 2020). .....  | 69 |
| <b>Tabla 5.</b> Carga bacteriana en membrana corioalantoídea y embrión de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de Rhea pennata. (agosto, 2020). .....   | 71 |
| <b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza para carga bacteriana en membrana corioalantoídea y embrión de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de Rhea pennata. (agosto, 2020). .....   | 72 |
| <b>Tabla 7.</b> Prueba de rango múltiple de Duncan para carga bacteriana en membrana corioalantoídea y embrión de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de Rhea pennata. (agosto, 2020). .....   | 73 |
| <b>Tabla 8.</b> Frecuencia de bacterias en diferentes estructuras internas (membrana de la cascara, albúmina, vitelo, membrana corioalantoídea y embrión) de huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de Rhea pennata. (agosto, 2020). ..... | 75 |
| <b>Tabla 9.</b> Matriz básica de datos de carga bacteriana (UFC/ml) .....   | 92 |
| <b>Tabla 10.</b> Matriz básica de datos de presencia bacteriana .....   | 93 |
| <b>Tabla 11.</b> Microbiota de los huevos en diferentes aves según porcentaje de aislamiento. ....  | 94 |
| <b>Tabla 12.</b> Distribución de la frecuencia de los microorganismos aislados de la cascara de los huevos rotos examinados (50 huevos). .....  | 94 |
| <b>Tabla 13.</b> Distribución de frecuencia de microorganismos aislados del contenido de los huevos (50 huevos). .....  | 94 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 14.</b> Diagnostico bacteriológico de 27 huevos de choique que presentaron contaminación .....                       | 95 |
| <b>Tabla 15.</b> Frecuencia de presentación de microorganismos en 41 huevos desechados durante el proceso de incubación ..... | 95 |
| <b>Tabla 16.</b> Distribución de microorganismos aislados en diferentes estructuras del huevo al primer miraje. ....          | 96 |
| <b>Tabla 17.</b> Distribución de microorganismos aislados en diferentes estructuras del huevo al segundo miraje.....          | 96 |
| <b>Tabla 18.</b> Distribución de cepas aisladas en diferentes estructuras de huevos no eclosionados.....                      | 97 |



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

TSI: Agar hierro tres Azucres

LIA: Agar Lisina Hierro

SIM: Medio Sulfuro, Indol y Movilidad

EMB: Agar Eosina Azul de Metileno

PEBLT: Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca

SERFOR: Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre

DIGESA: La Dirección General de Salud Ambiental

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods

RAM: Microorganismos aerobios mesófilos



## RESUMEN

La investigación determinó las bacterias presentes en huevos desechados del periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea Pennata*. El estudio se llevó a cabo en Perú, Región de Puno, Provincia El Collao, sector de Humajalso, módulo Chapuco y las muestras se analizaron en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano desde diciembre del 2018 hasta mayo del 2019. Se tomó como muestra, 38 huevos desechados del periodo de incubación natural en semi cautiverio. Se analizó la carga bacteriana con dos criterios, huevos que tenían formación de embrión y los que no. Las estructuras analizadas fueron la membrana de la cascará, albúmina, vitelo, membrana corioalantoídea y embrión. Se realizó el conteo de aerobios mesófilos viables mediante el método de recuento en placa y para el aislamiento e identificación, se utilizó medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Los datos obtenidos fueron analizados mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de rango múltiple de Duncan. En huevos sin embrión, se determinó una carga bacteriana media de  $504 \times 10^6$  UFC/ml en la membrana de la cáscara; en la albumina y vitelo se obtuvo una carga bacteriana media de  $166 \times 10^6$  y  $163 \times 10^6$  UFC/ml. El análisis estadístico señala que la mayor contaminación bacteriana se presenta en la membrana de la cascará ( $p < 0.0001$ ). En los huevos con embrión se determinó un valor de carga bacteriana de  $448 \times 10^6$  UFC/ml; en la membrana corioalantoídea se obtuvo una carga  $11 \times 10^6$  UFC/ml. El análisis estadístico señala que la mayor contaminación bacteriana se presenta en el embrión ( $p < 0.0001$ ). Se logró aislar e identificar cuatro tipos de bacterias, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* Se concluye que la especie bacteriana más frecuente en las cinco estructuras internas del huevo del Suri analizadas fue *Escherichia coli*.

**Palabras Clave:** Bacterias, Eclosión, Huevos, Contaminación, Suri.



## ABSTRACT

The investigation to determine the bacteria in discarded eggs during the natural incubation period in semi-captivity of *Rhea Pennata*. The study was carried out in Peru, Region of Puno, El Collao Province, Humajalso sector, Chapuco module and the samples were analyzed in the Food Microbiology Laboratory of the National University of the Altiplano from December 2018 to May 2019. The sample was taken of 38 discarded eggs from the natural incubation period in semi-captivity. The bacterial load was analyzed taking two criterias, in the eggs that had embryo formation and those that did not. The internal structures analyzed were the shell membrane, albumin, yolk, chorioallantoic membrane and embryo. The numbering of viable mesophilic aerobes was performed by the plate count method and culture media and biochemical tests were used for the isolation and identification. Statistical analysis was performed with descriptive statistics, analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test with 95% confidence. A medium bacterial load of  $504 \times 10^6$  CFU/ml was determined in the shell membrane; in albumin and yolk, a medium bacterial load of  $166 \times 10^6$  y  $163 \times 10^6$  CFU/ml respectively was obtained in eggs without embryo formation. The Statistical analysis indicates that the highest bacterial contamination occurs in the shell membrane ( $p < 0.0001$ ). A bacterial load value of  $448 \times 10^6$  CFU/ml was determined in embryonic eggs and a load of  $11 \times 10^6$  CFU/ml was obtained in the chorioallantoic membrane. Statistical analysis indicates that the highest bacterial contamination occurs in the embryo ( $p < 0.0001$ ). Four types of bacteria were isolated and identified: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* In conclusion, the most frequent bacterial species in the five internal structures of the Suri egg analyzed were *Escherichia coli*.

**Keywords:** Bacteria, Hatching, Eggs, Contamination, Suri.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCION

Existen diferentes especies habitando el sur del Perú, una de las principales es el Suri (*Rhea pennata*) que se distribuye en la zona sur del Perú entre los departamentos de Puno, Tacna y Moquegua. Con el transcurrir de los años, su población ha disminuido de forma alarmante, por eso fue considerado en la categoría en peligro crítico (CR) de la lista de clasificación y categorización de las especies amenazadas de fauna silvestre legalmente protegidas (D. S. N° 04-2014-MINAGRI), prohibiéndose su caza, captura, tenencia, transporte o exportación con fines comerciales (PELT, 2008).

Razón por la cual, es importante contribuir con investigaciones que ayuden a preservar al suri. El suri es un animal perteneciente al grupo de aves, que no están adaptadas para el vuelo y que poseen miembros posteriores muy desarrollados que les permiten correr a grandes velocidades, tienen una singularidad y es así que el macho es el que incuba los huevos ya que las hembras solo ponen los huevos en el nido y se retiran. Los huevos usualmente son depositados por las hembras e incubados por macho en nidos en los cuales existen algunos huevos que no llegan a eclosionar por diferentes factores que condicionan los índices de fertilidad estos son básicamente, las condiciones ambientales, el comportamiento reproductor, la edad de los reproductores, la genética, la nutrición, el manejo y la contaminación microbiana. La contaminación microbiana es uno de los factores en controversia como causa de menor fertilidad e incubabilidad de los huevos y la muerte embrionaria en avestruces (Carbajo *et al.*1997).

En el caso del suri no se posee información específica de bacterias que hayan sido identificadas en huevos que fueron desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. Un caso especial de pérdida de huevos en algunos



nidos lo constituye la infección bacteriana de los mismos que provoca la putrefacción y a la larga su estallido (SERFOR 2015).

Por lo que esta investigación busca aislar e identificar tipos de bacterias que se encuentran presentes en los huevos de suri desechados durante el periodo de incubación en semi cautiverio de *Rhea pennata*. Las bacterias son un grupo de organismos que se encuentran presentes como parte normal en diferentes ambientes, y algunas son causantes de enfermedades que conllevan a la muerte. En el caso de los huevos desechados del periodo de incubación no se han identificado y no se tiene conocimiento específico de cuáles podrían ser causales de muerte embrionaria y contaminación de sus estructuras internas.

Es de vital importancia, identificar las bacterias que causan contaminación en huevos de suri ya que, con su identificación exacta, se podrían tomar medidas preventivas de bioseguridad y disminuir la muerte embrionaria. Algunos estudios encuentran un 13% de embriones muertos con infecciones bacterianas, reduciéndose el porcentaje de fertilidad e incubabilidad, particularmente en las infecciones por *Staphilococcus spp* y *Streptococcus spp*. (Brown et al., 1996).

### **1.1. OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar las bacterias presentes en huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata* mediante el análisis bacteriológico.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Cuantificar la carga bacteriana presente en diferentes estructuras internas (Membrana de la cascara, Albúmina, Vitelo, Membrana corioalantoídea y Embrión) de huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*.



- Aislar e Identificar bacterias presentes en diferentes estructuras internas (Membrana de la cascara, Albúmina, Vitelo, Membrana corioalantoídea y Embrión) de huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**



## 2.1. ANTECEDENTES:

Ortiz & Cumpa (2016), determinaron las causas de mortalidad embrionaria tanto en incubación natural como en incubación artificial de los huevos de la pata criolla. Se incubaron 900 huevos de los cuales 778 fueron fértiles. Las principales causas de mortalidad embrionaria tanto para incubación natural como artificial son consecuencia de la contaminación de los huevos, así como de las mal posiciones y malformaciones embrionarias. Se concluye en tres importantes motivos para la presentación de malformaciones con mayor frecuencia, características genéticas almacenamiento prolongado y contaminación de la cascara de los huevos.

Campuzano *et al.* (2015), evaluaron la calidad microbiológica de algunos alimentos preparados y servidos en puestos ambulantes cercanos a la universidad de Bogotá, en donde se realizó el recuento de mesófilos aerobios y otros microorganismos. Este recuento refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación y las condiciones sanitarias de la materia prima. Para el análisis de microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras se utilizó la técnica de recuento en placa por profundidad en donde se sembró por duplicado cada una de las diluciones. Los hallazgos obtenidos en este estudio en la universidad de Bogotá D. C. califican la mayoría de los puestos de venta ambulatoria de alimentos con un conteo de mesófilos aerobios que superan los límites permitidos de inocuidad de los alimentos y califican los puestos con un riesgo sanitario alto.

Vásquez *et al.* (2018), realizaron un estudio en el queso fresco industrial proveniente de las principales empresas de la ciudad de Cajamarca, la investigación determinó la carga



microbiana del queso fresco industrial, así como evaluó la calidad bacteriológica del mismo, mediante lo establecido por la Norma Sanitaria que constituye los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. Para ello se tomó un total de 30 muestras de 0.5 kg cada una proveniente de 6 empresas productoras de queso fresco industrial (A, B, C, D, E y F).

Se realizaron los análisis microbiológicos pertinentes para la determinación de mesófilos viables, coliformes, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*. Se usó el diseño completamente al azar con 5 repeticiones. Al concluir el proceso de análisis se reportó los siguientes valores promedio de carga microbiana: mesófilos viables  $1.06 \times 10^5$  UFC/g, coliformes totales  $6.32 \times 10^3$  NMP/g, coliformes fecales  $4.75 \times 10^3$  NMP/g, muestras positivas para *Escherichia coli* 33.3%, *Staphylococcus aureus*  $4.02 \times 10^3$  UFC/g y ausencia de *Salmonella spp.*

Cubillos *et al.* (1981), investigaron la presencia bacteriana en 115 huevos de ganso, desechados en diferentes etapas de incubación (58 huevos al primer miraje, 40 al segundo miraje y 17 no eclosionados), examinándoseles diversas estructuras según su etapa de desarrollo (membrana de la cáscara, albúmina y vitelo, además de membrana corioalantoídea y embrión). Del total de huevos desechados el 35.65 % presentó crecimiento bacteriano. Entre los gérmenes aislados el de mayor presentación fue: *Escherichia coli* (46.34 %), *Staphylococcus* (31.70 %) y *Alcaligenes* (19.51 %). La distribución de gérmenes según tinción y morfología permitió evidenciar un 54.75 % de bacilos Gram negativos, 11.73 % de bacilos Gram positivos y 33.50 % de cocos Gram positivos (tablas 15, 16, 17,18).



Bruce & Drysdale (1994), mencionaron la microbiota de los huevos de diferentes aves en porcentaje de aislamientos (tabla 11) (pata, aves acuáticas, gallina y pava.) encontrándose: *Enterobacterias*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, Mohos, y otros sin identificar.

Brown *et al.* (1996), mencionaron que la industria del avestruz en Sudáfrica (y en otros lugares) experimenta una alta tasa de mortalidad de embriones durante la incubación artificial de huevos. La mayor parte de esta mortalidad tiene lugar en los últimos 10 a 14 días de incubación. Se realizaron exámenes post mortem en 111 embriones que murieron dentro de este período para evaluar las causas de esta mortalidad. La mala posición y el edema severo fueron los síntomas predominantes de los embriones muertos en el caparazón, con un 55% de mala posición y un 41% con edema grave. De estos, 22 embriones (24%) mostraron ambos síntomas. La mala posición generalmente es el resultado de un montaje incorrecto de los huevos o un giro inadecuado y el edema se correlacionó significativamente con la cantidad de agua perdida de los huevos, lo que a su vez se correlacionó con el tamaño del huevo. Se encontraron miopatía, lesiones macroscópicas de los órganos internos, hemorragia, infecciones bacterianas y deformidades congénitas en menos del 10% de los pollitos examinados para estos síntomas.

Chang *et al.* (2004a), realizaron un estudio durante la temporada de reproducción del 2000, se monitoreó el éxito de eclosión y la mortalidad embrionaria de 724 huevos de ñandú menor de 12 granjas en el norte de la Patagonia, Argentina. En donde infertilidad promedio fue 24,5%, la mortalidad embrionaria fue 33,5%, la incubabilidad de huevos



fértiles fue 66,5% y la mortalidad neonatal fue 57,0%. La contaminación bacteriana fue alta y la incubabilidad de los huevos también se vio afectada por la aparición de embriones edematosos y malformados. No se encontraron relaciones significativas entre la pérdida embrionaria, la duración del almacenamiento del huevo, el peso inicial del huevo o la pérdida de peso de los huevos eclosionados y fallidos. La baja productividad en las granjas de ñandú menor se debe no solo a la mortalidad embrionaria, sino también a una alta incidencia de huevos infértiles y mortalidad neonatal. La infección bacteriana puede no haber sido la causa más importante de falla en la incubación, lo que indica que las deficiencias nutricionales y la endogamia pueden jugar un papel importante en la productividad de estas granjas.

Chang (2001), realizó un informe técnico en donde se determinó los parámetros fisiológicos normales y los principales problemas sanitarios de choiques o ñandú overo (*Pterocnemia pennata*) durante los meses de agosto – diciembre un total de 9 granjas de choiques enviaron huevos (infértiles y con mortalidad embrionaria) al laboratorio de Salud Animal del INTA Bariloche, donde se recibieron 88 huevos descartados durante el periodo de incubación artificial para cultivo bacteriológico y análisis patológico, solo se realizó análisis bacteriológico de 84 huevos (figura 34 , 35 y Tabla 12) y los 4 restantes se observó la presencia de deformaciones congénitas

Cabassi *et al.* ( 2004), realizaron un estudio entre enero de 2001 hasta diciembre de 2002, en donde se enviaron 543 huevos de avestruz para investigación bacteriológica. Los huevos fueron puestos por 387 avestruces domesticadas que sufrían trastornos de fertilidad y que provenían de 44 granjas ubicadas en diferentes áreas del norte y centro



de Italia. Las investigaciones microbiológicas mostraron aislamiento bacteriano en 105 (19,3%) de 543 huevos examinados, con una alta prevalencia de enterobacterias de la albúmina y la yema. En sólo unos pocos casos, el aislamiento bacteriano fue el resultado de la yema o la albúmina solamente. Se realizó una prueba de sensibilidad a antibióticos en aislamientos mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Siendo este el primer informe sobre el estado microbiológico de los huevos de granjas de avestruces ubicadas en diferentes regiones italianas

Carbajo *et al.* (1997), mencionaron que los Hongos y bacterias detectados en huevos y embriones-Foggin 1992; Deeming 1996; Brown, 1996: Bacterias (*Acinetobacter spp*, *Aeromonas spp*, *Bacillus sp*, *Eschericha coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella spp*, *Nocardia spp*, *Pleisomonas shigelloides*, *pseudomonas spp*, *Salmonella spp*, *Staphilococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bortedella spp*, *Alcaligenes spp*) y hongos (*Mucor spp*, *Scediosporum spp*, *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp*).

Deeming (1995a), investigo un lote de 320 huevos de avestruz de 9 granjas diferentes en Zimbabwe se incubaron en una operación de una sola etapa y se registró el destino de cada uno, la Incubabilidad fue sólo 37,2% y el resultado de las altas tasas de infertilidad y la contaminación (22,2% y 22,8%, respectivamente); variaba entre los huevos de diferentes granjas y la contaminación microbiana de los huevos era un problema importante y variado en los huevos de diferentes granjas que indican que se necesita más atención, tanto en aves criador y gestión nido.



Deeming (1996), investigo la incidencia del deterioro microbiano en tres lotes de huevos de avestruz, uno de África y dos de Europa, 18% y 21% de los huevos en cada lote estaban contaminados con bacterias y hongos, en este último se encontró con mayor frecuencia en los huevos que contenían embriones más avanzados, aunque la infertilidad y el prolongado almacenamiento reducen la eclosión, la alta incidencia de la contaminación microbiana se considera un problema significativo.

Ghalib *et al.* (2020), realizaron un estudio sobre la contaminación bacteriana en huevos con la cascara rota y su contenido, un total de 50 huevos fueron colectados de los mercados de la ciudad de Bagdad en Iraq, los resultados revelaron que la bacteria aislada en los huevos rajados es de 46 % y el contenido de los huevos 44%. las bacterias más frecuentes fueron las especies de la familia Enterobacteriaceae principalmente *E. coli*, (18 %) seguido de *Staphylococcus* que representa el 18% del total otras bacterias, *Enterococcus faecalis* (6%), *Enterobacter* (4%) (figura 12) y en el contenido se aisló *Pseudomonas* 14%, *Enterococcus faecalis* (8%), *Enterobacter* (2%) (figura 13). Se concluye que el consumo de los huevos con cascara rajada no deben ser usados para consumo humano.

Pereira *et al.* (2007), Investigaron la Penetración de *Vibrio mimicus* a través de la cáscara del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*) esta investigación consistió en determinar la capacidad de penetración del *Vibrio mimicus* a través de la cáscara del huevo. La investigación se realizó en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos en el año 2000. Se inoculó la superficie de la cáscara con la bacteria y se procedió a incubar las muestras por 72 horas a 25°C. Después de este período se observaron las muestras bajo el microscopio electrónico. Los resultados obtenidos



demuestran que el *Vibrio mimicus* se reproduce en la superficie externa de la cáscara del huevo de tortuga lora, y no es capaz de penetrarla después de las 72 horas de incubación a 25°C.

Carrillo & Audisio (2007), mencionan que el huevo al momento de la postura es estéril y posee pocos microorganismos, para que un microorganismo produzca alteraciones en el huevo debe penetrar a través de los poros de la cascara hasta la membrana interna y crecer sobre la membrana y alcanzar la clara o la yema, las bacterias asociadas con más frecuencia al deterioro son bacilos Gram-negativos: *Pseudomona fluorescens*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *alcaligenes*, *Proteus*, *Escherichia* y *Serratia*.

Lábaque *et al.* (2003), realizaron un informe de los agentes biológicos que contaminan los huevos de ñandú (*Rhea americana*) durante la incubación artificial. La limpieza de los huevos cuando se reciben y el período de almacenamiento antes de la incubación, se investigaron para evaluar sus efectos sobre la contaminación microbiana y la capacidad de eclosión. Un total de 14 bacterias (*Acinetobacter sp*, *Aeromonas sp*, *Alcaligenes sp*, *Bacillus sp*, *Cedecea sp*, *Citrobacter sp*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus sp*, *Pseudomonas sp*, *Salmonella gallinarum*, *Serratia ficaria*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*) y 4 (*Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Fusarium sp*, *Mucor sp*) especies de hongos fueron aislados dentro del huevo en el laboratorio. La contaminación microbiana fue mayor (24%) en huevos muy sucios que en los huevos que estaban limpios o sucio (16%). El éxito de eclosión fue menor (30%) para los huevos muy sucios, en comparación con 42% para huevos limpios o sucios. El porcentaje de contaminación microbiana de los huevos almacenados (10%) no difirió significativamente de los no



almacenados (5%). Los límites extremos inferior y superior de la tasa de infección estimada para huevos de ñandú (*Rhea americana*) incubados artificialmente eran 4% y 40%, respectivamente, siendo más alto que en las especies de aves de corral. Se concluye que la recogida de los huevos poco después por el que se reducirá el riesgo de contaminación microbiana.

Loaiza *et al.* (2011), realizaron un estudio para buscar *Salmonella* y otras bacterias contaminantes en huevos comerciales. Se muestrearon aleatoriamente 38 graneros expendedores de huevos de Medellín y Área Metropolitana, a su vez se escogieron al azar 6 huevos por granero para un total de 228 huevos estudiados. A cada huevo se le extrajeron 4 muestras, para un total de 912 muestras que se dividieron en grupos. Cada grupo de muestras fue procesado para cultivo bacteriano y PCR para *Salmonella*. Como resultado se aislaron *Bacillus sp*; *Pseudomonas sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp.*, *Citrobacter sp.*, *E. coli*, *Streptococcus viridans*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Sarcinas sp.*, *Acinetobacter sp*, *E. hermannii*, *Proteus* y *Stenotrophomonas maltophilia*. todos los cultivos y PCR fueron negativos para *Salmonella*.

Dominguez (2012), recopila información en su trabajo monográfico Aspectos microbiológicos del huevo y sus Derivados en donde menciona: Microbiota de la superficie de la cáscara del huevo y del interior de los huevos alterados (podridos) encontrándose los siguientes tipos de microorganismos: *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Eschericha*, *Favobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Sarcina*, *Serratia*, *Streptococcus*.



Sánchez (2013), determino la prevalencia de salmonelosis en huevos frescos de granjas avícolas en la provincia de Tungurahua. En total, se seleccionaron 450 huevos de gallina, distribuidas en 150 muestras procedentes de 50 granjas avícolas. Del total de las muestras fueron procesadas y analizadas, se encontró una prevalencia de *Salmonella Enteritidis* de 0.0133% (2/150). Estas muestras fueron confirmadas por pruebas bioquímicas y serotipificación.

Akbar *et al.* (2015), recolectaron un total de 16 huevos de diferentes granjas y mercados para aislar la carga microbiana aeróbica total y la carga de bacterias patógenas en su caparazón y en su contenido. Las bacterias aeróbicas 118 se aislaron de las muestras, de las cuales 116 provenían de cáscaras de huevo y 2 de los contenidos de huevos de una muestra de huevo individual. Las bacterias positivas de Gram (*Staphylococcus*) se encontraron predominantemente presentes en la cáscara de huevo. Las cáscaras de huevo también se encontraron contaminadas con bacterias patógenas (*Salmonella* y *Escherichia coli*).

Solís (2016), menciona que en los huevos aparece principalmente *Micrococcus sp* que resiste a las condiciones de sequedad que presenta 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*.



Brand *et al.* (2017), refieren que el éxito de eclosión de huevos de avestruz es pobre (50-60% de los huevos fértiles)

## 2.2. MARCO TEÓRICO:

### 2.2.1. Suri (*Rhea pennata*)

El suri es el ave más grande de Perú, sin capacidad de vuelo, en contraposición posee los miembros posteriores muy desarrollados que le permiten desplazarse a una gran velocidad, desarrollan velocidades de hasta 60 Km/hora; llegan a medir en total un promedio 1,5 m. y 1m de las patas al lomo, con un peso promedio al estado adulto, de 25kg en hembras y en machos 26 Kg. (PEBLT, 2017). El Suri o “ñandú petizo” se distribuye en el altiplano andino del Perú, Bolivia, Chile y Argentina y; se encuentra amenazada de extinción, razón por la cual está protegido en los países donde se distribuye (SERFOR, 2015). Para este estudio se trabajó con la sub especie *Rhea Pennata tarapacensis*.

### 2.2.2. Clasificación taxonómica

La posición taxonómica del suri es la siguiente (PELT, 2008):

**Reino:** Animal

**División:** Chordata

**Subphylum:** Vertebrata

**Superclase:** Gnathostomata

**Clase:** Aves

**Subclase:** Neornitthes

**Superorden:** Neognathae

**Orden:** Struthioniformes

**Suborden:** Struthioni

**Familia:** Rheidae

**Género:** Rhea

**Especie:** *Rhea pennata* (D.S. N° 034-2004-AG).

Sinónimo: *Pterocnemia pennata*

**Sub especies:** *Rhea pennata pennata* d'Orbigny, 1834

*Rhea Pennata tarapacensis* Chubb, 1913

*Rhea pennata garlepi* Chubb, 1913



**Figura 1.** El suri (*Rhea pennata*).

### 2.2.3. Hábitat del Suri

El Suri habita desiertos y arenales altoandinos de la ecorregión puna desde los 3,800 msnm hasta las más altas cumbres; presenta una diversidad vegetal escasa con predominancia de pajonales y bofedales. Habita la zona Altiplánica sobre los 4,000



msnm. El hábitat de esta especie pertenece a la Zona de Vida de Tundra Muy Húmeda Alpina - Tundra Pluvial Alpina, entre los 4,500 a 5,300 msnm. Encontrándose suelos con características de vegetación arbustiva especialmente de “tholas” de los géneros *Parastrephya* y *Baccharis*, extensas zonas de pajonales del tipo *Stipa ichu* y *Festuca orthophyla* entre otros, también se caracteriza por la presencia de bofedales. Entre las características del hábitat del Suri, se definen dos áreas de preferencia: los bofedales o zonas húmedas como áreas de alimentación, cuya composición florística está dado principalmente por los Géneros *Distichia*, *Oenothera*, *Hypsela*, y otros; estratos vegetales más altos como estepas de gramíneas constituida por diversas especies, que junto con *Parastrephya*, en lugares rocosos conforman áreas preferidas de anidación de estas aves (PELT, 2008).

#### **2.2.4. Sistema reproductivo en la Hembra**

El ovario está situado en el abdomen, al lado izquierdo del riñón, produce óvulos (yemas) y hormonas sexuales como el estrógeno. Todos los óvulos que el ave producirá están ya presentes al empollar. Una vez maduros, los óvulos son liberados dentro del oviducto para ser fertilizados por los espermatozoides del macho y dar así inicio a la formación del huevo. Durante la estación de apareamiento el ovario es semejante a un racimo de uvas. El oviducto es un órgano tubular, unido al ovario y a la pared abdominal, es el que transporta la yema, produce albúmina, membranas de cáscara, la cáscara y la cutícula. Este órgano expelle el huevo ya formado hacia la cloaca y de allí al exterior. Como las gónadas se agranda enormemente durante la estación de apareamiento, para acomodar la producción de huevos (PELT, 2008).

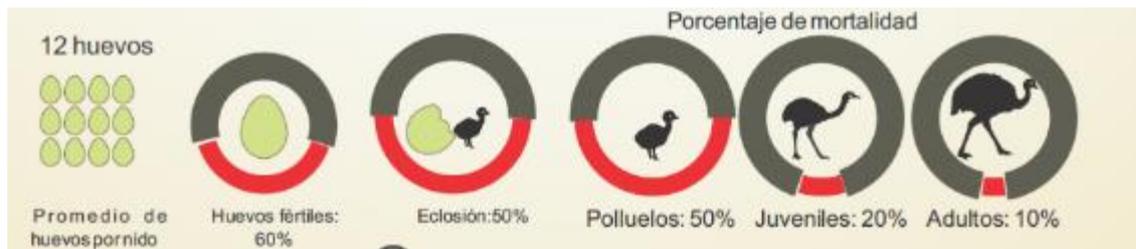
#### **2.2.5. Conducta reproductiva**

Tanto las hembras como los machos son muy similares en apariencia. Las hembras son un poco más pequeñas y livianas en su peso corporal. Esta especie es polígama; el macho



es poligínico, reúnen a varias hembras a las que corteja y fecunda. Las hembras son poliándricas, ya que copulan con varios machos. En agosto comienzan los cortejos, las bandadas comienzan a disgregarse, por lo que comienzan los enfrentamientos entre machos para disputarse a las hembras y ver quién es el dominante, se aprecia el incremento de la agresividad. Por lo general las hembras no emiten sonidos, solo los machos emiten fuertes sonidos guturales, parecido al sonido del motor de camión, llamado que puede oírse a gran distancia. La defensa del territorio por parte del macho dominante es constante y no permite que ningún otro macho invada su territorio (PELT, 2008).

Una vez definido el harén se dedica al cortejo de las hembras para ello exhiben su plumaje erecto, abriendo sus alas en abanico, se aproximan a las hembras lentamente, al comienzo se ve una cierta indiferencia por parte de las hembras, pero luego se sientan en señal de aceptación de la cópula. El macho se le acerca y la hembra se echa apoyada sobre su vientre. La postura de huevos gemelamente comienza en septiembre, donde varias hembras colocan sus huevos en un mismo nido, en intervalos de dos días. Llegan a colocar de 10 a 20 huevos por hembra, dependiendo de su madurez sexual. El macho es el encargado de buscar un lugar adecuado para construir el nido y realizar la incubación que dura alrededor de 40 días, etapa en el que el macho disminuye su alimentación. Los polluelos son nidífugos, no permanecen más de dos días en el nido, el cuidado del macho continua en esta época, les enseña a comer, refugiarse, protegerse del frío y de depredadores. Hasta los seis meses son asistidos por el macho, a los 16 meses alcanzan su tamaño definitivo y a los dos o tres años llegan a la madurez sexual. Pasada la época reproductiva, los individuos se reúnen formando una gran tropilla, no existiendo rivalidad entre los machos (PELT, 2008).



**Figura 2.** Indicadores de reproducción en el centro de rescate. (PELT, 2017).



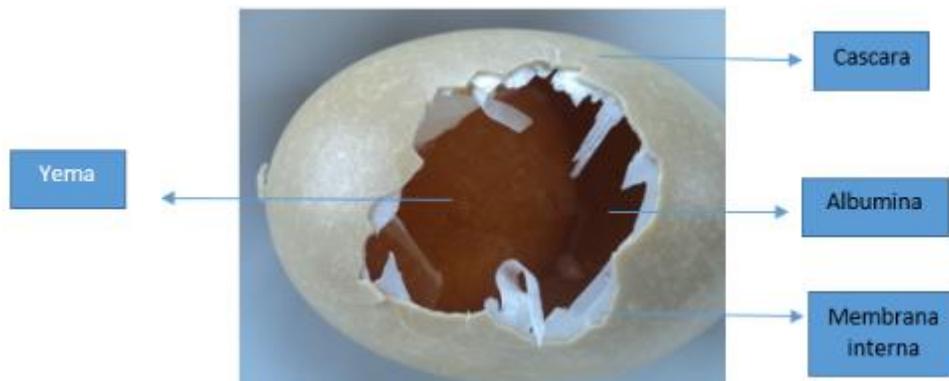
**Figura 3.** Macho realizando la incubación y una hembra buscando dejar sus huevos.

### 2.2.6. Huevo

El huevo de gallina está formado por un 9.5% de cascara, 63% de clara y 27.5% de yema la cascara posee muchos poros y está constituido por carbonato de calcio y la recubre una cutícula que es una barrera importante contra la invasión bacteriana siendo esta la reguladora de gases, dos pares de membranas separan la clara de la cascara y la otra se encarga de rodear a la yema, posee una cámara de aire localizada en la parte ancha del huevo (Carrillo & Audisio, 2007).

El huevo de avestruz tiene un peso 1.300 y 1700 gramos y sus dimensiones son 13 x 16 cm poseyendo una coloración de crema a beige, pueden llegar a pesar de 1kg a más de 2kg. El espesor de la cascara es de 2mm de grosor y representa el 15 al 20% del total del peso del huevo aproximadamente unos 300g, el otro 25% corresponde a la yema o vitelo con aproximadamente 400g y el 55% restante del albumen o clara es de 800g, el huevo de avestruz es equivalente a 24 huevos de gallina (Carbajo et al 1997).

Los huevos de suri presentan una coloración amarillo verdusco con algunos puntos oscuros el tamaño es 12 a 15 cm de largo, poseen un diámetro que va de 7 a 8 cm, su peso es variable de 400g a 680g. Siendo 10 veces más grande que el huevo de una gallina (PEBLT, 2017). (Figura, 4).

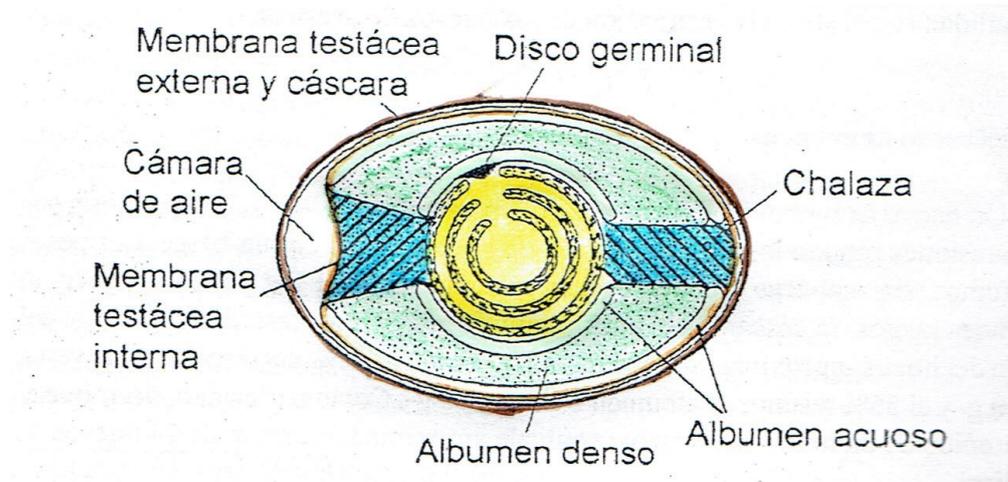


**Figura 4.** Huevo de suri indicando sus partes. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano (enero 2019).

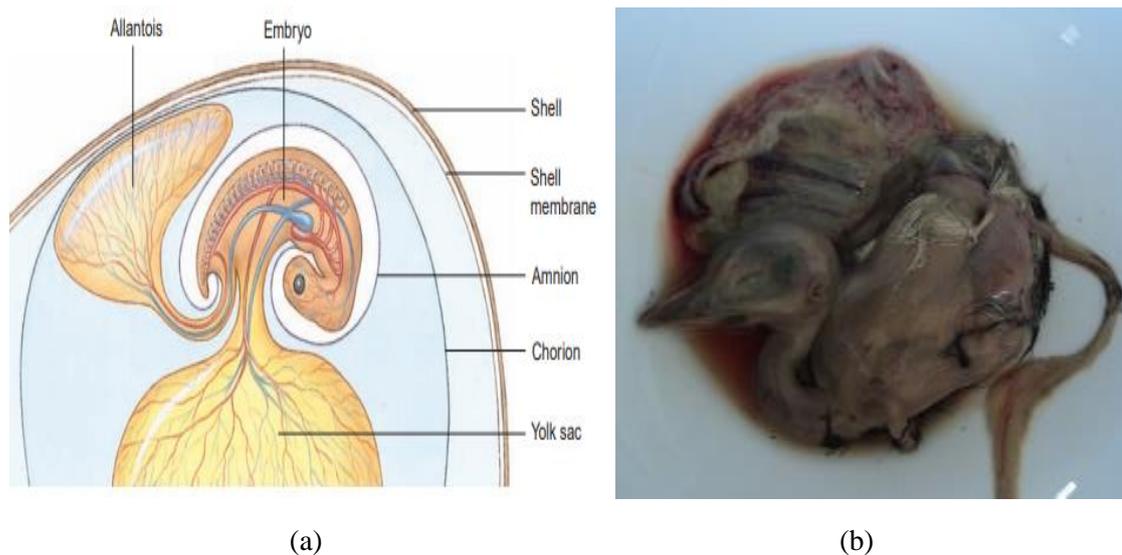
### 2.2.7. Estructuras Internas del Huevo

El huevo de avestruz posee diferentes partes internas empezando por la membrana testácea interna, albumen acuoso, albumen denso, yema con un disco germinal, además también podemos encontrar la chalaza y la cámara de aire (Carbajo et al 1997). (Figura,

5). Además, cuando el huevo es fecundado podemos encontrar la formación del embrión, saco vitelino, membrana corioalantoídea (Figura 6).



**Figura 5.** Esquema del Huevo de Avestruz (Carbajo *et al.* 1997).



**Figura 6.** (a) Partes internas del huevo con formación de embrión (Allan Larson *et al* 2009) (b) Embrión de suri (*Rhea pennata*). Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano (enero 2019).

### 2.2.8. Calidad microbiológica del huevo

#### - Calidad microbiológica

El criterio microbiológico para un alimento define la aceptabilidad de un producto (o un lote) de un alimento, basada en la ausencia o presencia, o en la cantidad de

microorganismos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote (MINSA/DIGESA, 2008).

#### - Norma microbiológica

Los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad están sujetos a lo expresado en la Norma Técnica de Salud N° 071 – MINSA/DIGESA-V.01 del 2008 (Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano).

**Tabla 1.** Huevos y ovoproductos

| <b>Huevos con cáscara</b>  |           |       |   |   |                     |                 |
|--|-----------|-------|---|---|---------------------|-----------------|
| Agente microbiano  | Categoría | Clase | n | c | Limite por g o ml   |                 |
|  |           |       |   |   | m                   | M               |
| Aerobios mesófilos   | 2         | 3     | 5 | 2 | 10                  | 10 <sup>2</sup> |
| <i>Salmonella spp.</i>   | 10        | 2     | 5 | 0 | Ausencia/25 g ó mL  | .....           |
| <b>Huevo (clara y/o yema) y ovo productos pasteurizados, líquidos, congelado y/o deshidratado.</b> |           |       |   |   |                     |                 |
| Aerobios mesofilos   | 2         | 3     | 5 | 2 | 5 x 10 <sup>4</sup> | 10 <sup>6</sup> |
| Mohos  | 2         | 3     | 5 | 2 | 10                  | 10 <sup>2</sup> |
| coliformes   | 5         | 3     | 5 | 2 | 10                  | 10 <sup>2</sup> |
| <i>Salmonella spp.</i>   | 10        | 2     | 5 | 0 | Ausencia/25 g ó mL  | .....           |

Nota: Grado de riesgo de los microorganismos (categoría), no se tolera a cierto microorganismo (clase 2), se tolera cierta cantidad (clase 3), muestras al azar (n), número máximo de muestras rechazables (c), límite mínimo permisible (m) y límite máximo permisible (M). Fuente: (MINSA/DIGESA, 2008)

#### 2.2.9. Bacterias aerobias mesófilos

Conjunto de microorganismos capaces de desarrollarse a temperaturas que oscilan entre 30°C a 37°C. El recuento de aerobios mesófilos estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos (ICMSF, 2000).



Recuentos altos, en alimentos estables, a menudo indican materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario, mientras que, en los productos perecederos, pueden indicar también condiciones inadecuadas de tiempo y temperatura durante su almacenamiento (ICMSF, 2000).

Los recuentos de mesófilos aerobios en placa son útiles para determinar la potabilidad de un agua, lo usual es que el agua de buena calidad para consumo humano tenga cuentas bajas <100 UFC por mililitro (Castañeda Briones, 2013).

#### **2.2.10. Aspectos generales sobre Recuento microorganismos Mesófilos**

El objetivo de realizar este análisis es conocer el número de microorganismos aerobios mesófilos (RAM) que contiene un alimento, este método es uno de los indicadores microbiológicos de calidad más utilizado y se aplica a todos los alimentos con excepción de los productos fermentados o madurados tales como queso, ciertos tipos de embutidos, yogur, etc.(Pinto, 2017)

Los resultados de este análisis permiten:

- Verificar efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección.
- Determinar si las temperaturas aplicadas en los procesos fueron las adecuadas.
- Determinar el origen de la contaminación durante los procesos de elaboración de los alimentos.
- Verificar condiciones óptimas de almacenamiento y transporte.
- Obtener información acerca de la vida útil de los alimentos.
- Indicar alteración incipiente en ciertos alimentos.

#### **2.2.11. Vías que producen contaminación en el huevo**

La contaminación microbiana del huevo puede producirse por dos vías (Bruce & Drysdale, 1994):



- Transmisión vertical, transovárica u oviductal: Contaminación del albumen y/o membrana vitelina y/o la yema por microorganismos que se encuentran en el ovario de la gallina o durante su paso por el oviducto.
- Trasmisión horizontal o transcascárida: contaminación posterior a la puesta, cuya causa suele ser ambiental. Esta vía supone la contaminación inicial de la superficie del huevo, seguida de la penetración subsiguiente del microorganismo en el albumen o en algunos casos directamente en la yema.

### **2.2.12. Bacterias**

Las bacterias agrupan el mayor número de especies patógenas para los seres humanos. Son organismos unicelulares que contienen DNA y RNA, pero no están diferenciadas en núcleo y citoplasma; se reproducen por fisión binaria (Koneman et al., 2008). El tamaño de las bacterias es alrededor de 0.1 y 5  $\mu\text{m}$  o más de longitud. Compuestas por ADN y ARN, aunque la información genética no está organizada dentro del núcleo (procarionte) (Mendo, 2003). las bacterias poseen una estructura relativamente simple ya que son microorganismos procariotas, es decir unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplasmático y se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas una pared celular grampositiva con una gruesa capa de péptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa (Murray et al., 2009).

### **2.2.13. Forma y Tamaño Bacteriano**

- **Forma:**



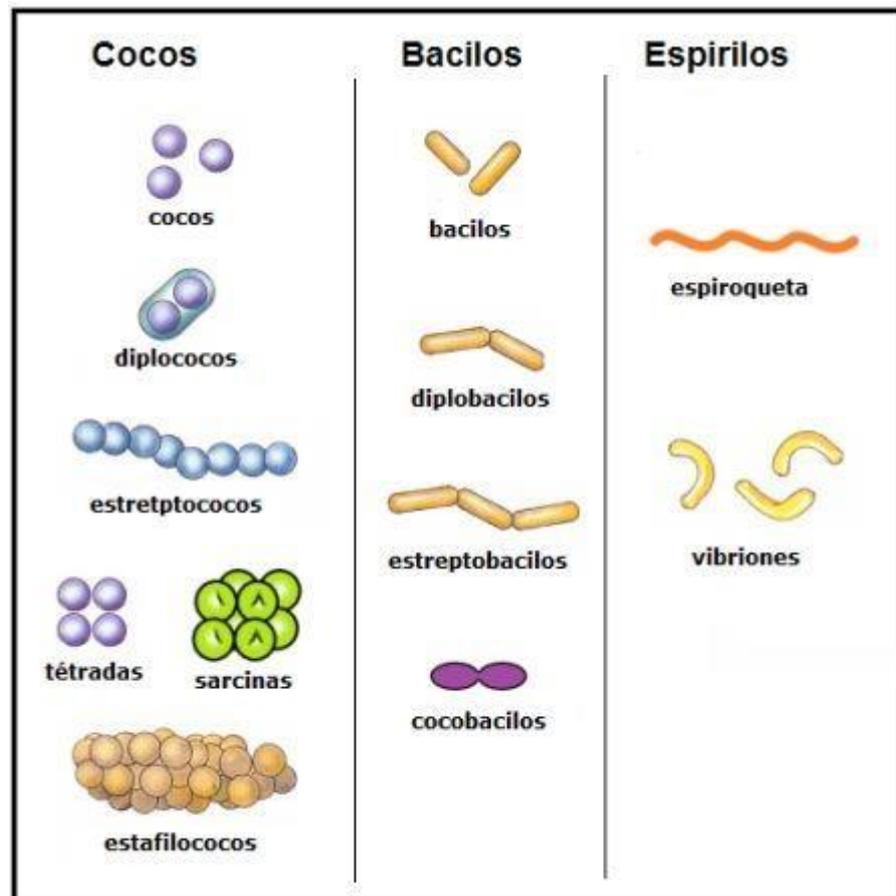
Básicamente las bacterias presentan tres formas: esféricas, cilíndricas y helicoidales. Dentro de las esféricas podemos encontrar las redondas (estafilococos), ovoides (estreptococos), lanceoladas (neumococo), reniformes (neiserias) y según su orientación de división y su rapidez en separarse; diplococos, estreptococos, estafilococos, tétradas y sarcinas. Dentro de las cilíndricas (bacilos), podemos encontrar rectas (enterobacterias), incurvadas (vibrión colérico), ramificadas (actinomices), y por otro lado los bacilos por dividirse por fisión binaria transversal mediante un plano perpendicular al eje mayor como los diplobacilos, estreptobacilos, empalizadas o en L, V o letras chinas. Además, encontramos las helicoidales que presentan una sola incurvacion o con varias incurvaciones (Mendo, 2003).

Según su morfología las bacterias tienen cuatro morfologías básicas: células esféricas o cocos; células en forma de bastones o bacilos; células en forma de espiral o espirilos; y células en forma de coma o vibrios (Koneman et al., 2008).varios grupos de bacterias pueden ser inmediatamente reconocidos gracias a sus formas peculiares. Por ejemplo, las espiroquetas, que son bacterias con forma de sacacorchos y las bacterias con apéndices, que presentan protuberancias celulares en forma de largos tubos o tallos o las bacterias filamentosas que forman células largas y delgadas o cadenas de células (M. Madigan et al., 2004). La tinción Gram es una técnica diferencial que divide a la mayoría de las bacterias en dos grupos bacterias grampositivas y gramnegativas. (Koneman et al., 2008).

- **Tamaño:**

Las bacterias tienen un tamaño entre 0.2-2  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1- 6  $\mu\text{m}$  de longitud (Koneman et al., 2008). Las bacterias suelen medirse en micrómetros. Como término

medio, un coco suele tener 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, los bacilos oscilan entre 1-5 y 6-8  $\mu\text{m}$  de longitud y las espiroquetas entre 10 y 15  $\mu\text{m}$  (Mendo, 2003).



**Figura 7.** Diferentes formas y Tamaños de bacterias (Castañeda Briones, 2013).

#### 2.2.14. Bacterias Grampositivas

Poseen una pared celular que es una capa gruesa y homogénea y el peptidoglicano tiene un grosor de 10 a 20 nm. En algunas bacterias como el *Streptococcus pyogenes* del grupo A, se encuentran proteínas y polisacáridos y recubren al glucopeptido, formando un polisacárido grupo-específico (polisacárido C), que aparece recubierto a su vez por una proteína (proteína M) tipo-específico, se suele encontrar, aunque solamente en las bacterias grampositivas, ácidos teicoicos que parecen que intervienen en el mantenimiento de la integridad de la pared celular y son lugares de recepción de fagos, y su importancia



es tal que pequeñas modificaciones estructurales alteran tanto el patrimonio antigénico de la bacteria como su susceptibilidad a la lisis fagica (Mendo, 2003).

La mayor parte de las paredes celulares de las bacterias grampositiva contienen cantidades considerables de ácidos teicoico y teicuronico, los cuales constituyen hasta el 50% del peso seco de la pared y 10 % del peso seco de la totalidad de la célula, algunas paredes de las bacterias grampositivas pueden contener moléculas de polisacáridos.(Carroll et al., 2016).

Una bacteria grampositiva posee una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglucano que rodea la membrana citoplásmica. El peptidoglucano es un exoesqueleto en forma de malla con una función semejante a la del exoesqueleto de los insectos. Sin embargo, a diferencia de esta última estructura, el peptidoglucano de la célula es lo suficientemente poroso como para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática. El peptidoglucano es un elemento clave para la estructura, la replicación y la supervivencia de las células en las condiciones normalmente hostiles en las que proliferan las bacterias. El peptidoglucano puede degradarse mediante el tratamiento con lisozima. Esta enzima es capaz de degradar el esqueleto de glucano del peptidoglucano. Sin el peptidoglucano, la bacteria sucumbe a las grandes diferencias de presión osmótica existentes a uno y a otro lado de la membrana citoplasmática y experimenta un fenómeno de lisis (Murray et al., 2009).

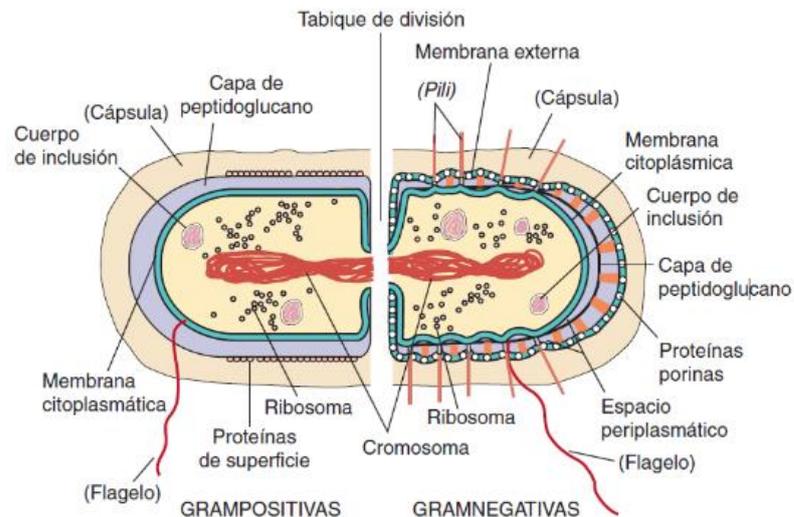
#### **2.2.15. Bacterias Gramnegativas**

Las paredes celulares gramnegativas son más complejas tanto desde el punto de vista estructural como químico. Desde el punto de vista estructural, una pared celular gramnegativas contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplásmica. Inmediatamente por fuera de la membrana citoplásmica se encuentra una delgada capa de



peptidoglucano que representa tan sólo un 5% a 10% del peso de la pared celular. Además, la pared celular gramnegativas no contiene ácidos teicoicos ni lipoteicoicos. En la parte externa de la capa de peptidoglucano se halla la membrana externa, la cual es exclusiva de las bacterias gramnegativas. La zona comprendida entre la superficie externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la membrana externa se conoce como espacio periplásmico. Este espacio es un compartimento que contiene diversas enzimas hidrolíticas importantes para la degradación y metabolización por la célula de las macromoléculas de gran tamaño. Habitualmente, estas enzimas son proteasas, fosfatasas, lipasas, nucleasas y enzimas metabolizadoras de carbohidratos. En el caso de las especies bacterianas gramnegativas patógenas, muchos de los factores de virulencia líticos (p. ej., colagenasas, hialuronidasas, proteasas y b-lactamasa) se encuentran en el espacio periplásmico. La pared celular de los gramnegativos está atravesada también por distintos sistemas de transporte, que incluyen los dispositivos de secreción de tipos I, II, III, IV y V. Estos sistemas de transporte aportan mecanismos para la captación y liberación de distintos metabolitos y otros compuestos (Murray et al., 2009).

Además, el peptidoglicano es solo una pequeña porción de la pared en la que predominan las proteínas, fosfolípidos y lipopolisacaridos que se unen formando otras capas (Mendo, 2003). La estructura de la pared celular bacteriana tiene importancia práctica y directa para los microbiólogos porque su tipo es una gran parte responsable de la reacción de tinción de Gram (Koneman et al., 2008).



**Figura 8.** Esquema general de un corte transversal de una célula bacteriana. Lado izquierdo grampositiva, lado derecho gramnegativa (Murray et al., 2009).

#### 2.2.16. Aislamiento de Bacterias

Permite la separación de los microorganismos al estado de pureza a partir de una muestra problema. Se requiere un medio sólido con gran superficie para que los microorganismos al ser diseminados sobre el medio, generen su progenie (cepa) por formación de colonias separadas. Si se aíslan especies distintas, cada colonia tendrá caracteres especiales, la morfología bacteriana será también distintiva. Existen tres tipos de aislamiento (Mendo, 2003):

- **Aislamiento por Estrías**

La placa de estrías se utiliza fundamentalmente para aislar cultivos puros de muestras que contienen flora mixta. En este aislamiento podemos estudiar la morfología y la coloración de colonias, susceptibilidad a los antibióticos, es muy importante para el diagnóstico y la identificación. Las superficies de agar deben ser suaves y húmedas, pero sin exceso de humedad todo este proceso se debe realizar cerca de un mechero para evitar la contaminación.



- **Aislamiento por diseminación**

Se realiza mediante la pipeta Pasteur estéril se toma una mínima cantidad de inóculo. El dedo índice de la mano derecha debe cubrir la abertura superior, para evitar se vacíe el contenido, el inóculo es depositado en el margen de agar, con la varilla horizontal de la espátula de Digrafsky o alambre doblado de asa, se distribuye el inóculo por toda la superficie del medio, evitando pasar dos veces por el mismo plano, la tapa de la placa debe levantarse solo lo necesario para evitar la contaminación.

- **Aislamiento por difusión**

Esta técnica se aplica de preferencia para análisis cuantitativos bacterianos. Por ejemplo, para conocer el N° de microorganismos por mililitro de muestra en agua, leche y alimentos. Para preparar las diluciones básicas puede usarse agua amortiguada esterilizada, solución esterilizada de NaCl al 0.85% o medio de cultivo esterilizado.

### **2.2.17. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se usan en el laboratorio para el cultivo de los microorganismos. En microbiología se usan dos tipos generales de medios de cultivo: los químicamente definidos y los complejos. Los medios definidos se preparan añadiendo cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos purificados a un volumen en agua destilada, donde se sabe la composición química exacta de un medio definido. Los medios complejos pueden ser entonces adecuados e incluso ventajosos por varias razones. Los medios complejos emplean hidrolizados de caseína, carne roja, soya, levaduras u otras sustancias nutritivas (M. Madigan et al., 2004). La técnica y medios de cultivo utilizados dependen de la naturaleza de la investigación en donde podemos encontrar tres situaciones: en donde sea necesario cultivar un grupo de células de una especie en particular que se encuentren a la mano; puede ser necesario establecer el



número y tipo de microorganismo presente en un material dado, o podría desearse el aislamiento de un tipo particular de microorganismo a partir de la fuente natural (Carroll et al., 2016). Los medios de cultivo se clasifican (Mendo, 2003):

- Por su origen (medios sintéticos o definidos, medios complejos o indefinidos llamados naturales).
- por su consistencia (medios líquidos llamados caldos y medios solidos los cuales contiene agar).
- Por su composición (medios semisólidos, medios enriquecidos, medios de enriquecimiento, medios selectivos en los cuales encontramos los medios de identificación o diferenciales que son aquellos que permiten distinguir a simple vista dos o más tipos de bacterias en función de su distinto comportamiento respecto de algún nutriente del medio que se traduce en un viraje de color de una sustancia indicadora presente en el medio (medios diferenciales únicos o simples, por ejemplo: agua peptona da, medios de cultivo combinados, por ejemplo: TSI.).

La interpretación de los cultivos primarios después de 24 a 48 horas de incubación requiere una habilidad considerable a partir de la observación inicial el microbiólogo debe determinar la naturaleza de las colonias aisladas y decidir si requieren de otros procedimientos. Los parámetros relevantes son las características y el numero relativo de cada tipo de colonia que se aisló en el cultivo de agar; la pureza, la reacción Gram y la morfología de las bacterias en cada tipo de colonia; y los cambios en los medios, los cuales reflejan la actividad metabólica de las bacterias en las colonias adyacentes. (Koneman et al., 2008).



### 2.2.18. Estafilococos

Los estafilococos son células esféricas grampositivas por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas se desarrollan en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que van desde el color blanco hasta un amarillo intenso (Carroll et al., 2016). El nombre del género *Staphylococcus* se refiere a que las células de estos cocos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas, sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas. La mayor parte de los estafilococos tiene un diámetro de entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  y son anaerobios facultativos (es decir, crecen aerobia y anaerobiamente) inmóviles capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal (p. ej., cloruro sódico al 10%) y a temperaturas de 18-40 °C. Las colonias de *S. aureus* son doradas como consecuencia de los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento y que dan el nombre a la especie. Es la única especie presente en las personas que produce la enzima coagulasa. Cuando se suspende una colonia de *S. aureus* en un tubo con plasma, la coagulasa se une a un factor sérico y el complejo convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que da lugar a un coágulo. Dado que las restantes especies estafilocócicas carecen de la capacidad de producir coagulasa (Murray et al., 2009).

- Clasificación Taxonómica de *Staphylococcus aureus* según el manual de Bergey segunda edición (Koneman et al., 2008):

|          |                   |
|----------|-------------------|
| Dominio: | Bacteria          |
| Filo:    | Firmicutes        |
| Clase:   | Bacilli           |
| Orden:   | Bacillales        |
| Familia: | Staphylococcaceae |



Género: Staphylococcus

Especie: *Staphylococcus aureus*

### 2.2.19. Bacilos Grampositivos

El género *Bacillus* comprende grandes bacilos aerobios grampositivos que se organizan en cadenas. La mayor parte de los miembros es saprofita y vive en la tierra, agua, aire y en la vegetación, como *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*. Algunos son patógenos para los insectos. *Bacillus cereus* puede crecer en los alimentos y producir una endotoxina o una toxina emética que genera intoxicación alimentaria. (Jawetz, et al., 2012). los bacillus son catalasa positiva y facultativos caracterizados por la capacidad de formar esporas en condiciones aerobias. Suelen crecer bien en agar sangre, miden 1 x 3 a 4 µm, poseen extremos cuadrados y se disponen en formas de cadenas largas; las esporas se ubican en el centro de bacilo móvil (Koneman et al., 2008). Varias especies producen antibióticos (Tortora et al., 2007).

- Clasificación Taxonómica de *Bacillus sp* según el manual de Bergey segunda edición (Koneman et al., 2008).

Dominio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Clase: Bacilli  
Orden: Bacillales  
Familia: Bacillaceae  
Género: Bacillus  
Especie: *Bacillus sp*



### 2.2.20. Bacilos Gramnegativos

La familia Enterobacteriaceae es un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más). Algunos microorganismos entéricos como *Escherichia coli* son parte de la microbiota normal y en contadas ocasiones originan enfermedades, pero otros como las salmonelas y las shigelas siempre son patógenos para los seres humanos. La familia Enterobacteriaceae son bacilos anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia (Carroll et al., 2016).

*Escherichia coli* suele producir pruebas con positividad para indol, lisina descarboxilasa y fermentación de manitol y produce gas a partir de glucosa. Produce hemólisis en agar sangre, su morfología de colonia característica con un “brillo” iridiscente en medios diferenciales como agar EMB y una prueba de indol positivas. Más de 90% de las cepas de *E. coli* tiene positividad para glucuronidasa  $\beta$  si se utiliza el sustrato 4-metilumbeliferil- $\beta$ -glucurónido (MUG). La prueba de la oxidasa es negativa a menudo se pueden confirmar como *E. coli* con una prueba de MUG positiva (Koneman et al., 2008).

- Clasificación Taxonómica de *Escherichia coli* según el manual de Bergey segunda edición (Koneman et al., 2008).

|          |                     |
|----------|---------------------|
| Dominio: | Bacteria            |
| Filo:    | Proteobacteria      |
| Clase:   | Gammaproteobacteria |



Orden: Enterobacterales  
Familia: Enterobacteriaceae  
Género: Eschericha  
Especie: *Eschericha coli*

Salmonella son bacilos móviles que de manera característica fermenta la glucosa y manosa sin producir gas, pero no fermentan lactosa ni sacarosa, la mayor parte de las salmonelas producen H<sub>2</sub>S. a menudo son patógenas para el ser humano o los animales cuando se ingieren (Carroll et al., 2016).

- Clasificación Taxonómica de *Salmonella sp* según el manual de Bergey segunda edición (Koneman et al., 2008)

Dominio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Clase: Gammaproteobacteria  
Orden: Enterobacterales  
Familia: Enterobacteriaceae  
Género: Salmonella  
Especie: *salmonella sp*

Las pseudomonas tienen una amplia distribución en el suelo y el agua. *Pseudomonas aeruginosa* a veces coloniza al ser humano y es el principal microorganismo patógeno humano de las pseudomonas; es invasora y toxígena, produce infecciones en pacientes con defensas alteradas y es un microorganismo patógeno importante en los hospitales (Carroll et al., 2016).



- Clasificación Taxonómica de *pseudomona sp* según el manual de Bergey segunda edición (Koneman et al., 2008)

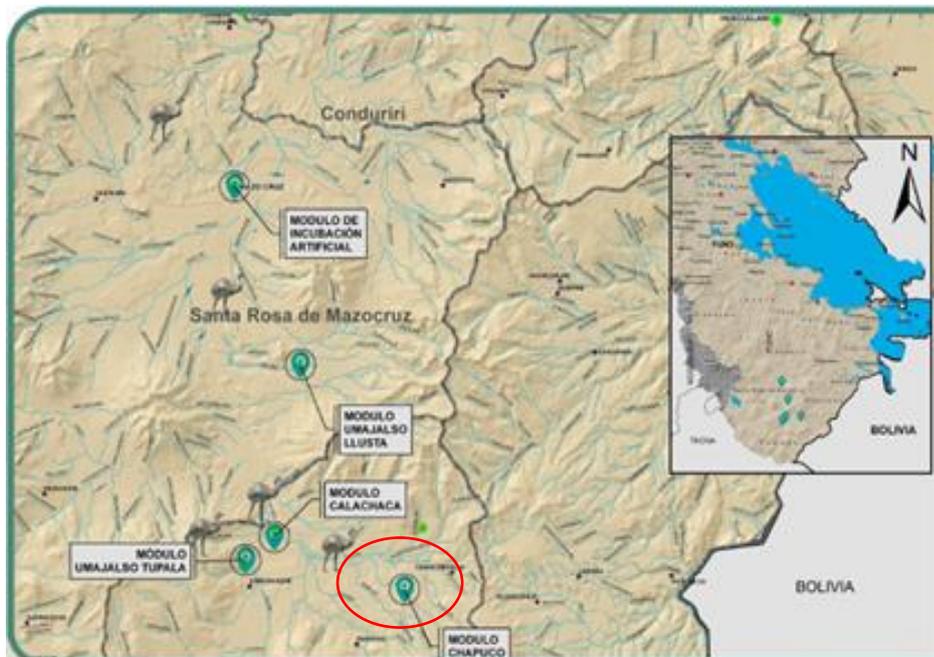
Dominio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Clase: Gammaproteobacteria  
Orden: Pseudomonadales  
Familia: Pseudomonadacea  
Género: Pseudomonas  
Especie: *Pseudomona sp*

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ZONA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Perú en la Región de Puno, Provincia del Collao, Distrito de Capazo, Centro Poblado de Tupala, Centro de Rescate del Suri del PEBLT, módulo Chapuco, zona alto andina, ecorregión puna, altitud 4354 msnm, coordenadas UTM WGS84 (Este 436 801 m Norte 8 118 384 m) y cuenta con un área de 230,12 hectáreas, el territorio se caracteriza por poseer especies tholares, el ichu y otros pastos propios de la puna seca y cuenta con algunos espacios de bofedales. además, cuenta con manantiales permanentes cuya calidad es apta para consumo de animales. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos del Programa Académico de Microbiología y laboratorio clínico de la escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, ubicado al sureste del centro de la ciudad.



**Figura 9.** Mapa de ubicación de la zona de estudio (PELT, 2008).



### **3.2 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN**

Se realizó un estudio de tipo descriptivo analítico, de nivel aplicativo, debido a que miden o evalúan y analizan diversos aspectos a investigar y en este caso se analiza la carga bacteriana presente en diferentes estructuras internas de 38 huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata* y se reúne información sobre el tipo de bacterias aisladas e identifican en diferentes estructuras internas del huevo de suri para conocer que bacterias son más frecuentes y posibles causantes de contaminación bacteriana.

### **3.3 METODOLOGÍA**

#### **3.3.1.1 Cuantificación de la carga bacteriana presente en diferentes estructuras internas de los huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*.**

##### **a. Frecuencia y Muestreo**

Considerando la naturaleza restringida del tamaño de la población de estudio, la muestra fue no probabilística, utilizando la técnica de muestreo por conveniencia que corresponden a 38 huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata* del Centro de Rescate del Suri del PEBLT, durante el mes de diciembre del 2018 y en los meses de enero a mayo del 2019.

##### **b. Descripción detallada de los equipos y materiales**

- Los equipos utilizados en este objetivo fueron Autoclave, Incubadora, Balanza analítica, Destilador de agua, cocinilla eléctrica, contador de colonias, licuadora.
- Medios de cultivo e insumos que se utilizó. Agar Plate Count, agua tamponada con fosfato, agua destilada.



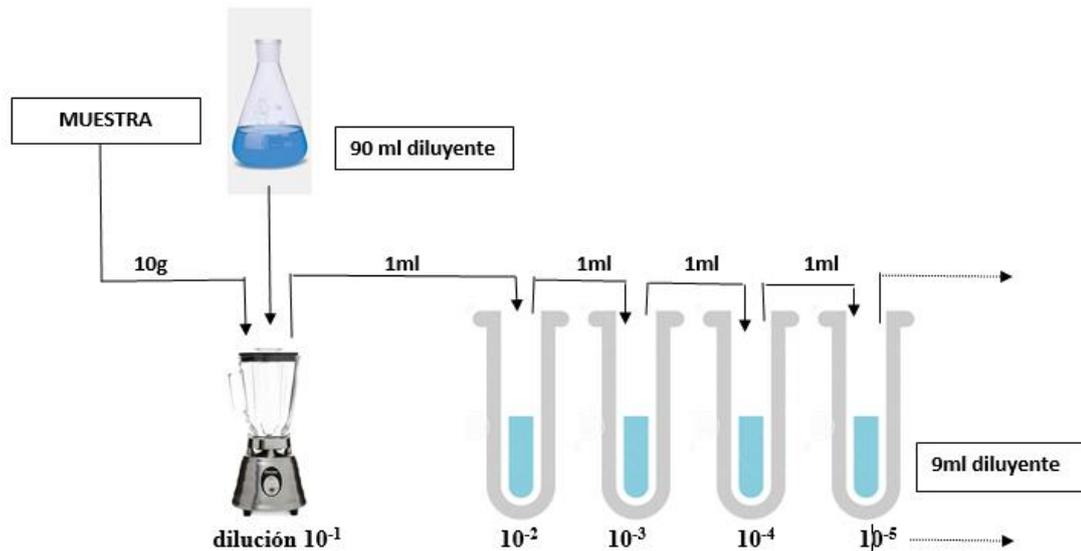
- Material Biológico utilizado en este objetivo fueron los huevos de suri (*Rhea pennata*) desechados, sangre de conejo y plasma.
- Materiales de laboratorio utilizados en este objetivo fueron pipeta, papel aluminio, cristalería (Erlenmeyer, Matraces, beakers), Cajas Petri, tubos de ensayo, probetas, pipetas, gradillas, mechero.

### **Numeración de microorganismos aerobios mesófilos viables**

#### **Método: Recuento estándar en placas o recuento en placa ´por siembra en profundidad**

Para cuantificar la carga bacteriana, las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano, en donde se procedió a analizar cada una de las muestras. Para ello, se esterilizó el material de vidrio y metal utilizando en el Autoclave Marca Binder color plomo y para superficies legía comercial al 5%, los huevos fueron desinfectados por fuera con povidona yodada al 10% para eliminar bacterias externas, posteriormente se rompió los huevos con un estilete estéril y se apertura el huevo con ayuda de unas pinzas, seguidamente se realizó diluciones seriadas de cada una de las partes de las estructuras internas del huevo mediante la técnica de dilución de muestras de alimentos recomendada por el International Standard Organización (ISO)(Mendo, 2003), se tomó 10ml de muestra en las partes líquidas del huevo( clara y yema) y en el caso de muestra sólidas (membranas y embrión) se tomó 10g de muestra, se añadió un volumen diluyente igual a 9 veces la muestra (90ml) para obtener la primera dilución, en caso de las muestras sólidas se colocó 10g de muestra en 90ml de agua destilada estéril ,mediante el uso de una licuadora marca Oster se homogeniza la muestra, de la muestra inicial y con la ayuda de una pipeta se

trasfiere 1ml a otro tubo que contiene 9ml de diluyente, luego mesclar con una nueva pipeta 1ml y así sucesivamente hasta lograr la dilución deseada.( Figura 10).

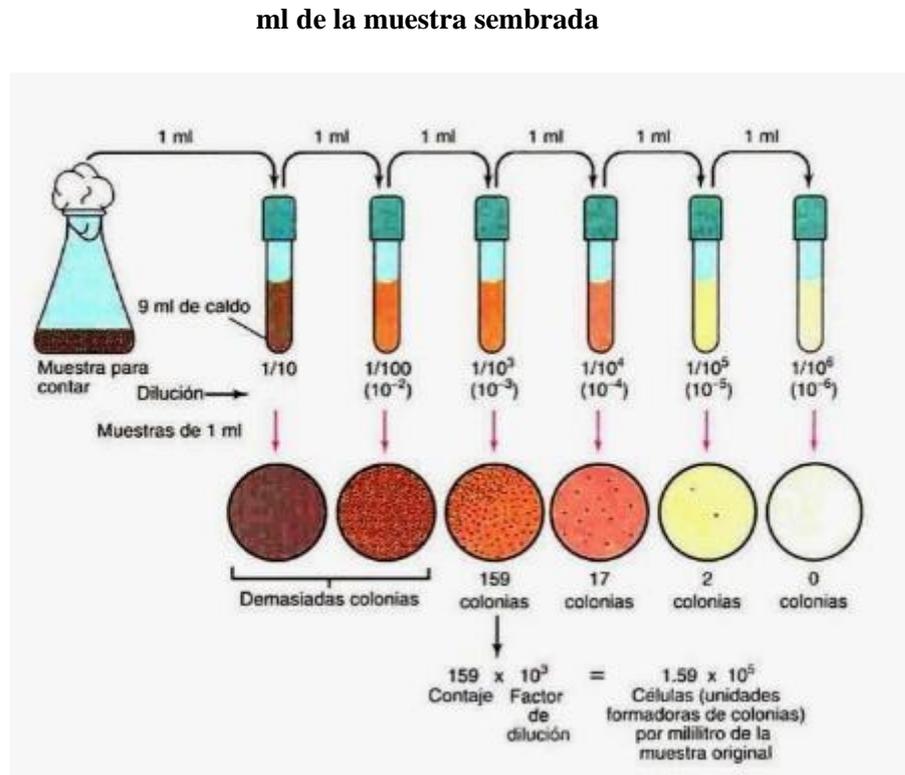


**Figura 10.** Representación esquemática de la técnica (Mendo, 2003).

Una vez obtenida las diluciones deseadas de acuerdo a la técnica anteriormente mencionada se pipeteó por triplicado a las placas Petri estériles, una alícuota de 1ml a partir de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  de muestra por cada placa Petri (figura 14). Se sugiere esta serie de diluciones si no se conoce el rango aproximado del número de bacterias, se agregó rápidamente a las placas Petri 15 ml de agar Plate count (Figura 11), para el control de esterilidad, se adiciono una placa Petri agar sin inocular y agar inoculado, las placas fueron llevadas e incubadas a  $29-31^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, luego de este periodo de tiempo se realizó el conteo de colonias, se seleccionó 2 placas correspondientes a una dilución que contenga entre 30 y 300 colonias (figura 15), las placas de todas las diluciones que mostraron más de 300 colonias se las dividió a cada duplicado de placas de la dilución más alta en secciones radiales convenientes (2,4,8) y se contó todas las colonias en una o más secciones, se multiplico el total de cada caso por

el factor apropiado para obtener el número de colonias por toda la placa (figura 16). Para calcular el número de unidades formadoras de colonia se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml o UFC/g} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias por placa} \times \text{el factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$



**Figura 11.** Diluciones seriadas de la muestra y método de siembra en placa.  
(M. T. Madigan & Clark, 2009)

### c. Variables que se Analizan

En este objetivo las variables fueron: variable dependiente el cual es el número de UFC en placa y la independiente fueron las partes de la estructura interna del huevo desechado

### d. Prueba estadística

Para el análisis de los datos se utilizó el software libre Lenguaje R. El cual realizó el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de rango múltiple de Duncan con un 95% de confianza, para determinar si existe diferencia significativa de la carga bacteriana entre las diferentes estructuras internas del huevo del suri (Membrana de la cascara, Albúmina,



Vitelo, Membrana corioalantoídea y Embrión). Se utilizó un diseño muestral no probabilístico, que es un muestreo por conveniencia, considerando la naturaleza restringida del tamaño de población de estudio. Los tratamientos fueron cinco con tres repeticiones para cada tratamiento de 38 huevos desechados de suri.

### **3.3.1.2 Aislar e identificar bacterias presentes en diferentes estructuras internas (Membrana de la cascara, Albúmina, Vitelo, Membrana corioalantoídea y Embrión) de los huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semicautiverio de *Rhea pennata*.**

#### **a. Frecuencia y muestreo**

Considerando la naturaleza restringida del tamaño de la población de estudio, La muestra fue no probabilística, utilizando la técnica de muestreo por conveniencia que corresponden a 38 huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata* del Centro de Rescate del Suri del PEBLT durante el mes de diciembre del 2018 y en los meses de enero a mayo del 2019.

#### **b. Descripción detallada de los equipos y Materiales**

- Los equipos utilizados en este objetivo fueron Autoclave, Incubadora, Balanza analítica, Destilador de agua, microscopio biológico óptico, cocinilla eléctrica, licuadora, centrifuga
- Medios de cultivo utilizados en este objetivo fueron Agar EMB (Agar Eosina Azul de Metileno), Agar Sangre, Agar Manitol Salado, Agar Phenylalanina
- Medios bioquímicos utilizados en este objetivo fueron TSI (Agar hierro tres Azucres), LIA (Agar Lisina Hierro), Citrato de Simmons, Agua de Triptona, Medio SIM (medio Sulfuro, Indol y Movilidad), Urea Agar Base (Christensen).



- Material Biológico utilizado en este objetivo fueron los huevos de suri (*Rhea pennata*) desechados y sangre de conejo y plasma.
- Reactivos y pruebas utilizadas en este objetivo fueron Reactivo kovacs, Agua destilada, Rojo de metilo, Aceite de inmersión, Batería Gram (Cristal violeta, Lugol, Acetona, Safranina), prueba de oxidasa, peróxido de hidrogeno, Povidona yodada al 10%, Agua destilada, agua tamponada con fosfato.
- Materiales de laboratorio utilizados en este objetivo fueron pipeta, papel aluminio, cristalería (Erlenmeyer, Matraces, beakers), Cajas Petri, tubos de ensayo, probetas, pipetas, gradillas, mechero, espátula Digralsky. Placas Petri, Láminas porta objetos, Algodón, Asas de Kolle, pinza, estilete, mechero, papel kraff, pavilo, guantes desechables, gasa, recipientes estériles, jeringas.

### **Aislamiento e identificación de bacterias en huevos desechados de suri**

**Método:** Para aislar e identificar bacterias en huevos desechados de suri se procedió en tres etapas:

- **Primera etapa:** las muestras de las diferentes estructuras internas del huevo de las diluciones tomadas para el conteo de UFC de la última dilución fueron inoculadas en dos medios de cultivo Agar sangre y Agar EMB (Koneman et al., 2008) (figura 14), mediante el método de siembra en extensión, en las placas se agregaron con una pipeta graduada un 1ml de la muestra y con ayuda de una espátula Digralsky se disemina el inculo, luego fueron llevados a la incubadora por 72 horas a 37 °C.
- **Segunda etapa:** las placas que presentaron crecimiento positivo de colonias se les realizo un marcado de las colonias por la parte posterior con un plumón indeleble marca FABER -CASTELL (figura 15), y se les realizo la coloración Gram a cada una de ella. Estas se dividieron en dos grupos Gram - negativas y Gram – positivos de



acuerdo a estos resultados se les realizo test bioquímicos y cultivo en medios selectivos (Koneman et al., 2008).

### **Método de Tinción Gram**

**Fundamento:** Cuando las bacterias se tiñen con el complejo colorante básico-mordiente, este queda atrapado en las bacterias grampositivas y no puede ser arrastrado por el decolorante a causa de la naturaleza físico-química de su pared. Por el contrario, en las gramnegativas es arrastrado debido a su alto contenido lipídico (Mendo, 2003) (figura 16). Se realizó la toma de muestra de las colonias representativas de cada una de las placas con una Asa de kolle. Se preparó en una lámina porta objeto limpio y libre de grasa una gota de solución salina para disolver la colonia, se deja secar al aire, para luego fijar la lámina por el mechero una o tres veces., una vez fijada la lámina se procedió con los siguientes pasos para realizar la coloración Gram de cada lamina:

1. Se colocó una cantidad suficiente de cristal violeta sobre la muestra, como para lograr cubrirla por completo. Se dejó actuar al colorante por 1 minuto.
2. Al transcurrir el minuto, se enjuago la lámina conteniendo la muestra con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua no debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. El chorro debe ser un chorro delgado, aproximadamente de medio a un centímetro de espesor. También el enjuague se debe realizar poniendo la lámina en posición inclinada hacia abajo.
3. Una vez enjuagado el portaobjetos, se aplicó como mordiente yodo o lugol durante 1 minuto más.



4. Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, el frotis se decoloro con alcohol-acetona, hasta que ya no escurra más líquido azul. Para esto se utilizó el gotero del frasco del decolorante. Se fue añadiendo cantidades suficientes del decolorante, hasta lograr que éste salga totalmente transparente, es decir, hasta que ya no escurra más líquido azul.
5. Se lavó con agua para quitar los residuos de decolorante y se esperó que seque la lámina al aire libre.
6. Una vez que la lámina ya secó, procedimos a teñir nuevamente, pero esta vez se utilizó un colorante de contraste como la safranina, y se dejó actuar durante 1 minuto.
7. Pasado el minuto correspondiente, se enjuago la lámina con agua, se escurrió el agua sobrante y se dejó secar.

De esta manera, se obtuvo el frotis para su respectiva observación microscópica a 100 X de los cuales se obtuvieron las siguientes capturas de imágenes en el microscopio. (figura 17).

- **Tercera etapa:** se realizó las pruebas bioquímicas de acuerdo a la tinción Gram para identificar las bacterias según su especie:

### **Prueba de la oxidasa**

**Fundamento:** La citocromooxidasa es una enzima del grupo de la porfirina ferrica muy difundido en la naturaleza. Ella oxida el citocromo c reducido y entonces se transforma ella misma en la forma reducida e inactiva. Por trasferencia de los electrones a oxigeno molecular la citocromooxidasa se transforma de nuevo en la forma activa. En presencia de oxigeno molecular el sistema citocromooxidasa, citocromo c puede reducir toda una serie de sustancias orgánicas, entre otras el llamado reactivo NaDi (1-naftol +



dimetilparafenilendiamina) con formación de la molécula de condensación, azul de indofenol. Esta reacción se emplea para clasificar e identificar bacterias.

**Procedimiento,** utilizamos un asa de kolle previamente esterilizado para coger una colonia bacteriana, luego impregnamos la masa de la colonia en una tira reactiva para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la citocromo-oxidasa. De la marca Bactident® Oxidasa 113300- Merck millipore, al cabo de aproximadamente de 20 a 60 segundos comparar con la escala colorimétrica. El resultado es positivo cuando la tira cambia a azul. (figura 18).

### **Prueba de la catalasa**

**Fundamento:** la catalasa es una enzima típica de las bacterias aerobias que tienen un metabolismo oxidativo, capaz de descomponer el agua oxigenada, que es un producto tóxico, en agua y oxígeno (Mendo, 2003).

La prueba de la catalasa se usa menudo para diferenciar los estafilococos (positivos) de los enterococos (negativo) o la especie *Bacillus* (positiva) la de *Clostridium tetani* (negativo) (Koneman et al., 2008).

**Procedimiento,** con un asa de kolle se toma una colonia y se extiende sobre una lámina porta objetos. Luego se adiciona una gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3%. La liberación de burbujas indica la liberación de  $O_2$  característico de un resultado de catalasa positivo. (figura 19).

### **Prueba de la coagulasa**

**Fundamento:** la coagulasa es una enzima que forma un coágulo cuando las bacterias son incubadas en plasma de conejo. El test es utilizado para diferenciar *Staphylococcus*



*aureus* (cuagulasa positiva) de *staphylococcus sp.* cuagulasa – negativa (Harvey et al., 2013).

**Procedimiento,** se extrajo sangre de conejo con una jeringa de la vena marginal de la oreja para obtener el plasma, se vertió 0.3ml de plasma de conejo en tubos estériles de 75 x 10mm, se toma con un asa las colonias de estafilococos y se mezcla con el plasma, se incubo a 35-37 °C, se examinó después de cuatro horas de incubación. (figura 20).

### **Prueba TSI**

**Fundamento:** En este medio la fermentación de los azúcares, que da lugar a la producción de ácidos, se detecta mediante el indicador rojo fenol. Los cambios de color (amarillo para la producción de ácido) y rojo para la alcalinización, son notables. El tiosulfato sódico se reduce a sulfuro de hidrogeno, el cual reacciona después de una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro negro. La degradación ocurre en la parte superior (pico de flauta), de la sacarosa en La parte intermedia y la glucosa es fermentada en la parte profunda (taco) y en condiciones aeróbicas. La presencia de cavidades en el medio es debido a la formación de gas (CO<sub>2</sub>) producto de la fermentación (Mendo, 2003).

**Procedimiento,** se inoculo los tubos con TSI con un asa de punta, se introduce la punta hasta unos 3 a 5mm de fondo del tubo, luego se retira el asa del fondo se estría el pico con un movimiento en zigzag de un lado al otro y se incuba a 35- 37<sup>0</sup>C durante 24 horas. (figura 21).

### **Prueba LIA**

**Fundamento:** Es un medio al que se ha incorporado lisina y se ha eliminado la lactosa. Este medio de diferenciación permite evidenciar la descarboxilacion y la desaminacion de la lisina, y también la producción de ácido sulfhidrico cuando se identifican a las



enterobacterias. Estas reacciones se ponen de manifiesto mediante el viraje del indicador purpura de bromocresol; y la formación de sulfuro de hidrogeno (H<sub>2</sub>S) a partir del tiosulfato sódico, se manifiesta por la formación de sulfuro ferroso. Aquellos organismos que producen rápidamente descarboxilación de lisina cambian la típica reacción ácida (color amarillo) y originan una reacción alcalina (color púrpura) en todo el medio, aquellos sin la enzima, producen una pendiente alcalina y una base ácida. (Mendo, 2003).

**Procedimiento**, se inocula los tubos que contenían el medio LIA, con un asa de punta, se introduce la punta a los lados del tubo hasta unos 3 a 5mm de fondo del tubo, luego se retira el asa del fondo y se incuba a 35- 37<sup>0</sup>C durante 24 horas. (figura 22).

### **Prueba Citrato de Simmons**

**Fundamento:** Recomendado para la diferenciación de enterobacterias en base a la utilización de citrato, siendo esta única fuente de carbono. Este agar es esencialmente medio de Koser al cual se han añadido azul de bromotimol y un 1.5% de agar. Los organismos capaces de metabolizar el citrato crecen exuberantemente. El medio está alcalinizado y cambia de su color verde inicial azul oscuro en 24-48 horas. Los coliformes fecales o no crecen en este medio o crecen tan esparcidamente que no es aparente ningún cambio en la reacción (Mendo, 2003).

**Procedimiento**, se inocula los tubos que contenían el medio Agar Citrato de Simmons, con un asa de punta, se estría el pico con un movimiento en zigzag de un lado al otro y se incuba a 35- 37<sup>0</sup>C durante 24 horas. (figura 23).



## **Prueba Indol**

**Fundamento:** El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs (Mendo, 2003).

**Procedimiento,** se inocular con un asa de punta en el medio de agua triptona y se llevó a incubación a 37°C durante 24 horas, luego del periodo mencionado, se agregan 5 gotas de reactivo de Kovacs (figura 24).

## **Manitol Salado**

**Fundamento:** El alto contenido de sal suprime el crecimiento de la mayoría de otras bacterias que no son Estafilococos. La degradación del carbohidrato manitol hasta ácido hace virar el indicador rojo de fenol a un color amarillo, esta propiedad es por lo general sinónimo de patogenicidad para el caso de Estafilococos (Mendo, 2003).

**Procedimiento,** se tomó una colonia con un asa de siembra y se inocular en el medio manitol salado, se llevó a incubación a 37°C por 24 a 48 horas.

## **SIM (Indol, Movilidad y Sulfuro de Hidrogeno)**

**Fundamento:** Se usa en la determinación de la producción de sulfuro de hidrogeno, la formación del indol y la movilidad de miembros de los grupos de *Salmonella* y *shigella*. Cualquier ennegrecimiento a lo largo de la línea de inoculación se considera una reacción



positiva al sulfuro de hidrogeno y por lo general se presenta entre 18 a 24 horas. Los cultivos móviles muestran un crecimiento difuso de turbidez lejos de la línea de inoculación e intensifican las reacciones de H<sub>2</sub>S (Mendo, 2003).

**Procedimiento**, se inoculo los tubos que contenían el medio SIM, con un asa de punta se introdujo una sola vez por el medio hasta una profundidad de unos dos tercios del medio y se incubo a 37<sup>0</sup>C durante 24 horas (figura 25).

### **Urea Agar Base (Christensen)**

**Fundamento:** Se utilizó para identificar bacterias que hidrolizan urea, tales como *Proteus spp.*, otras enterobacterias y estafilococos. la tripteina y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH. Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberando amoniaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el rojo de fenol del amarillo al rojo. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea, como especies de *Enterobacter* o *Klebsiella* (Mendo, 2003).

**Procedimiento**, se inoculo los tubos que contenían el medio Urea Agar Base, con un asa de punta se introdujo una sola vez por el medio hasta una profundidad de unos dos tercios del medio y se incubo a 37<sup>0</sup>C de 1 a 6 días (figura 26).

#### **c. Variables que se Analizan**

En este objetivo la variable dependiente son las Bacterias Aisladas e Identificadas y la variable independiente fueron las partes de la estructura interna del huevo desechado.



#### **d. Prueba Estadística**

Para el análisis estadístico en esta prueba se utilizó el software Excel el cual describe el porcentaje de frecuencia de las bacterias aisladas e identificadas en las diferentes estructuras internas del huevo de suri.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Carga bacteriana presente en diferentes estructuras internas (Membrana de la cáscara, Albúmina, Vitelo, Membrana corioalantoídea y Embrión) de huevos desechados de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*.

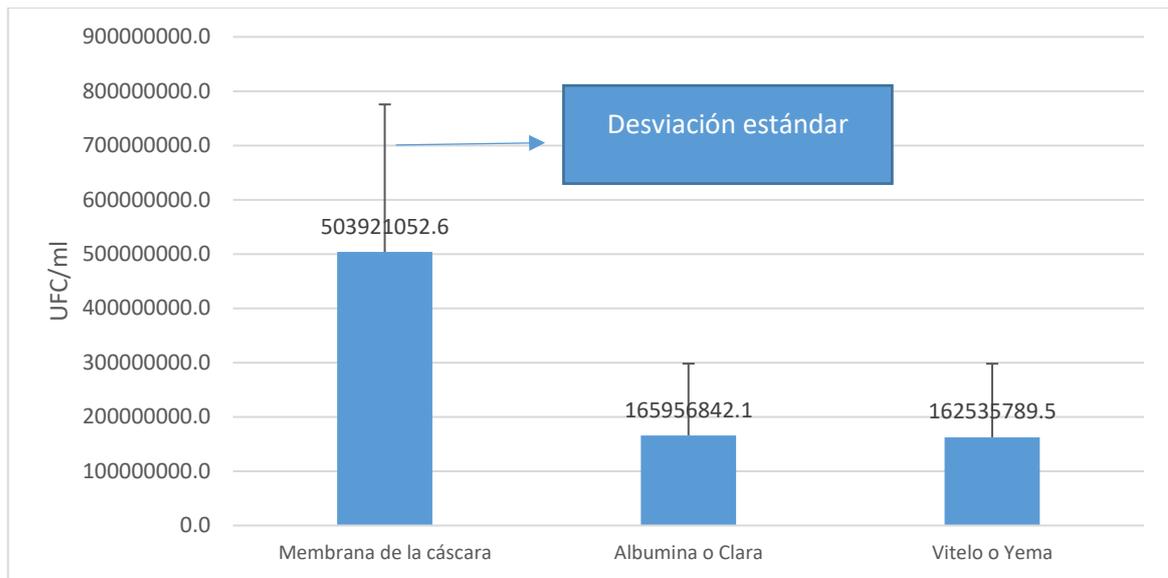
##### 4.1.1. Membrana de la cáscara, albumina o clara y vitelo o yema.

En este primer objetivo se considera la totalidad de la muestra analizada de huevos (38), considerando que en los mismos fue posible obtener muestras para cultivo bacteriano en tres partes del mismo.

**Tabla 2.** Carga bacteriana (UFC/ml) en membrana de la cáscara, albumina y vitelo de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. (agosto, 2020).

| Estadístico | Membrana de la cáscara | Albumina o Clara | Vitelo o Yema |
|-------------|------------------------|------------------|---------------|
| N           | 38                     | 38               | 38            |
| Mínimo      | 50000000.0             | 10100000.0       | 10100000.0    |
| Máximo      | 834000000.0            | 375000000.0      | 375000000.0   |
| Media       | 503921052.6            | 165956842.1      | 162535789.5   |
| D.E.        | 271659460.0            | 132247917.7      | 135484655.2   |

Fuente: elaboración propia



**Figura 12.** Carga bacteriana en estructuras internas de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata* (agosto 2020).

En la Tabla 2 y Figura 12, se observa que respecto a la carga bacteriana el valor mínimo se obtuvo en la albumina o clara y en el vitelo o yema de huevo del Suri con 10100000.0 o  $10 \times 10^6$  UFC/ml respectivamente, mientras que el valor máximo se presentó en la membrana de la cáscara 834000000.0 ( $834 \times 10^6$ ) UFC/ml, la media más elevada se obtuvo en la membrana de la cáscara con 503921052.6 ( $504 \times 10^6$ ) UFC/ml, mientras que la menor media se presentó en la albumina o clara con 132247917.7 ( $132 \times 10^6$ ) UFC/ml, la desviación estándar de los resultados indica que existe una mayor variación de la carga bacteriana en la membrana de la cascara de *Rhea pennata*.

En general se observa que la zona del huevo que presenta un mayor nivel de contaminación bacteriana fue la membrana de la cáscara, mientras que la menor contaminación se observa en el vitelo o yema del mismo.

Estos resultados fueron comparados con la Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano MINSA/DIGESA (2008), en donde indica que los parámetros para aerobios mesófilos en huevos son: los huevos con cascara en donde el mínimo es 10



UFC/ml o g y un máximo de  $10^2$  UFC/ml o g y en el caso de la clara y/o yema en donde el mínimo es  $5 \times 10^4$  UFC/ml o g y un máximo de  $10^6$ . Según estos valores con los cuales se comparan por los encontrados en esta investigación podemos indicar que los huevos de suri tanto en la membrana como en la albumina y la yema son elevadas.

El recuento alto de aerobios mesófilos determinan la calidad microbiológica de los alimentos, según ICMSF (2000), los recuentos altos, en alimentos estables, a menudo indican materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario, mientras que, en los productos perecederos, pueden indicar también condiciones inadecuadas de tiempo y temperatura durante su almacenamiento además Castañeda (2013), indica que los recuentos de mesófilos aerobios en placa son útiles para determinar la potabilidad de un agua en donde la calidad para consumo humano tengan cuentas bajas  $<100$  UFC por ml.

El recuento de aerobios mesófilos nos permite verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza, desinfección, el origen de la contaminación, condiciones óptimas de almacenamiento e indicar la alteración de ciertos alimentos. El cual concuerda con lo mencionado por Campuzano *et al* (2015), quien evaluó la calidad microbiológica de algunos alimentos preparados y servidos en puestos ambulantes cercanos a la Universidad de Bogotá D.C. en donde se realizó el recuento de mesófilos aerobios, el cual refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación y condiciones sanitarias de la materia prima, quien encontró que la mayoría de puestos de venta ambulatoria poseen un alto conteo de mesófilos aerobios que superan los límites permitidos de la inocuidad de los alimentos y califican los puestos con un riesgo sanitario alto.



Para determinar la carga microbiana y evaluar la calidad bacteriológica de los alimentos se utiliza lo establecido por la norma sanitaria que constituye los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos y bebidas de consumo humano Vásquez *et al* (2018), quien obtuvo en su investigación en el queso fresco industrial provenientes de las principales empresas de la ciudad de Cajamarca menciona que determino la carga bacteriana de 30 muestras provenientes de 6 empresas en donde determino los mesófilos viables y otros microorganismos, reportando un valor promedio de mesófilos viables de  $1.06 \times 10^5$  UFC/g. Los recuentos promedios de mesófilos viables encontrados en las empresas han superado el límite establecido por *ICMSF* (2006), que es  $10^5$  UFC/g, indicando que el alimento está contaminado.

En conclusión, podemos decir que los valores encontrados de carga bacteriana de mesófilos aerobios son importantes para determinar la calidad microbiológica de los alimentos y en el caso de esta investigación los mesófilos aerobios en la membrana de la cáscara, albumina o clara y vitelo o yema superan los parámetros establecidos por la Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano MINSA/DIGESA (2008). por consiguiente, podemos decir que estos huevos no son aptos para el consumo humano y se encuentran contaminados por microorganismos.

Para analizar si existe diferencia respecto a las tres zonas del huevo respecto a la carga bacteriana observada, se procedió con el análisis de varianza (ANOVA), considerando como única fuente de variación la localización de la muestra en el interior del huevo del Suri.

**Tabla 3.** Análisis de varianza para carga bacteriana en membrana de la cáscara, albumina y vitelo de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. (agosto, 2020).

| Fuente          | GL  | Suma de cuadrados       | Cuadrados medios        | F      | Pr > F          |
|-----------------|-----|-------------------------|-------------------------|--------|-----------------|
| Parte del huevo | 2   | 2923155181922810000.000 | 1461577590961400000.000 | 38.938 | < <b>0.0001</b> |
| Error           | 111 | 4166489696905270000.000 | 37535943215362800.000   |        |                 |
| Total corregido | 113 | 7089644878828080000.000 |                         |        |                 |

En la Tabla 3, el análisis de varianza en un solo sentido, permitió determinar que existe diferencia estadística significativa entre las partes del huevo respecto a la carga bacteriana obtenida ( $p < 0.0001$ ), de lo cual se interpreta que por lo menos una de las partes presenta una media diferente al resto, para verificar diferencias específicas entre las mismas, se procedió con la prueba de rango múltiple de Duncan.

**Tabla 4.** Prueba de rango múltiple de Duncan para carga bacteriana en membrana de la cáscara, albumina y vitelo de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. (agosto, 2020).

| Categorías             | Media         | Grupos de Duncan |
|------------------------|---------------|------------------|
| Membrana de la cáscara | 503921052.632 | A                |
| Albumina o clara       | 165956842.105 | B                |
| Vitelo o yema          | 162535789.474 | B                |

Las categorías con letra diferente son estadísticamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ )

En la Tabla 4, la prueba de rango múltiple de Duncan, permitió diferenciar en forma clara dos grupos (observe la letra de grupos), el primero formado únicamente por la membrana de la cáscara que presenta un valor superior de carga bacteriana con 503921052.632 ( $503 \times 10^6$ ) UFC/ml, mientras que el segundo grupo formado por la albumina o clara y el vitelo o yema presentan una similar carga, pero inferior en su media con 165956842.105 ( $165 \times 10^6$ ) y 162535789.474 ( $162 \times 10^6$ ) UFC/ml respectivamente.



De acuerdo a los resultados podemos decir que la mayor carga bacteriana se encuentra en la membrana de la cascara ya que esta parte del huevo se encuentra más cercana a la cascara en donde podemos encontrar la mayor carga bacteriana en caso de contaminación, el resultado es congruente por lo dicho por Deeming (1995b), quien indica que las vías más frecuentes de contaminación de los huevos de avestruz es la cascara, debido a que esta tiene contacto con las heces vía transcloacal, por contacto de superficies contaminadas o contaminación del nido Pereira *et al* (2007), realizan un estudio sobre la penetración del *Vibrio mimicus* a través de la cascara del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivácea*) en donde determino que el *Vibrio mimicus* se reproduce en la superficie externa de la cascara del huevo de tortuga lora penetrando solo después de 72 horas de incubación. Este resultado apoya lo encontrado en esta investigación que encuentra que la membrana de la cascara posee la mayor carga bacteriana ya que se encuentra cerca de la cascara.

En caso de la albumina y la yema en donde la carga bacteriana es menor es posible que corresponda a que el huevo posee barreras químicas que retrasan el crecimiento microbiano. Siendo los más importantes la lisozima, la conalbúmina y el pH alcalino O'Leary & Busta (1974). Otro punto que apoya esta afirmación es lo mencionado por Carrillo & Audisio (2007), quien indica que un microorganismo pueda producir alteración en el huevo, primeramente debe penetrar a través de los poros de la cascara hasta la membrana interna, crecer sobre la membrana y luego alcanzar la clara y luego la yema.

En conclusión, podemos decir que para que un microorganismo pueda penetrar al interior de la estructura del huevo, la carga bacteriana debe de ser alta en la cascara, penetrar mediante los poros y crecer en la membrana interna para luego colonizar y crecer tanto en la albumina y la yema.

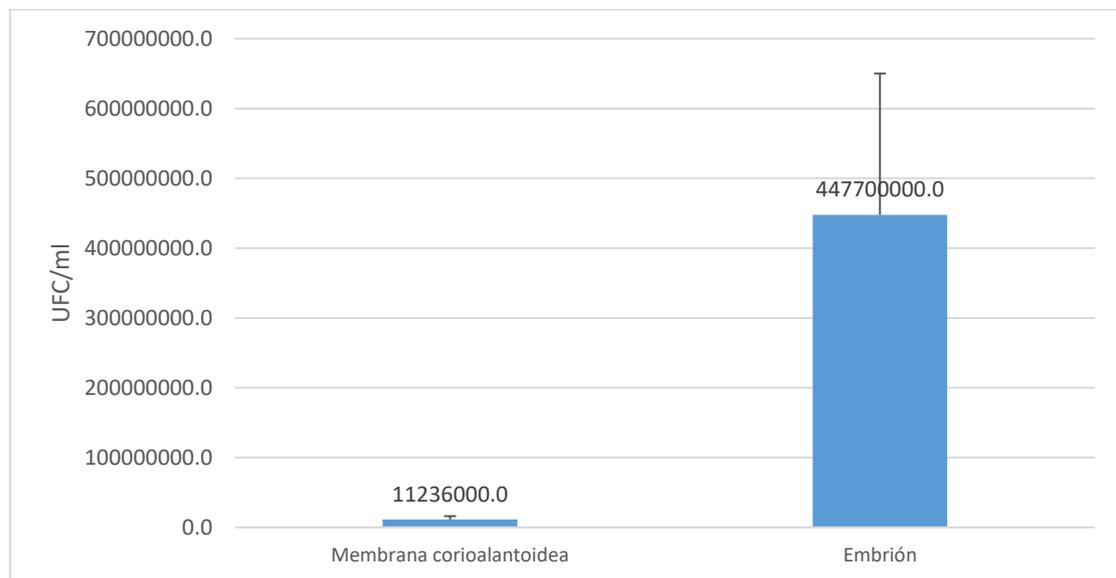
#### 4.1.2. Membrana Corioalantoídea y Embrión

De la totalidad de 38 muestras de huevos de Suri, se determinó que 10 de ellos llegaron a la etapa de formación de embriones, es decir que la contaminación bacteriana se produjo en una etapa posterior al primer grupo de huevos, los resultados de este grupo se muestran considerando dos componentes adicionales.

**Tabla 5.** Carga bacteriana en membrana corioalantoídea y embrión de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. (agosto, 2020).

| Estadístico | Membrana corioalantoídea | Embrión     |
|-------------|--------------------------|-------------|
| N           | 10                       | 10          |
| Mínimo      | 4000000.0                | 44000000.0  |
| Máximo      | 20000000.0               | 642000000.0 |
| Media       | 11236000.0               | 447700000.0 |
| D.E.        | 4843135.8                | 202518665.8 |

Fuente: elaboración propia



**Figura 13.** Carga bacteriana en membrana corioalantoídea y embrión de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. (agosto 2020).

En la Tabla 5 y Figura 13, se observa que respecto a la carga bacteriana el valor mínimo se obtuvo en la membrana corioalantoídea del huevo del Suri con 4000000.0 ( $4 \times 10^6$ ) UFC/ml, mientras que el valor máximo se presentó en el embrión con 642000000.0 ( $642 \times 10^6$ ) UFC/ml, la media más elevada se obtuvo en el embrión con 447700000.0 ( $448 \times 10^6$ ) UFC/ml, mientras que la menor media se presentó en la membrana corioalantoídea con 11236000.0 ( $11 \times 10^6$ ) UFC/ml, la desviación estándar de los resultados indica que existe una mayor variación de la carga bacteriana en el embrión formado en el huevo de *Rhea pennata*.

En general se observa que la zona del huevo que presenta un mayor nivel de contaminación bacteriana se encuentra en el embrión, mientras que la menor contaminación se observa en la membrana corioalantoídea.

Para analizar si existe diferencia respecto a las dos zonas del huevo respecto a la carga bacteriana observada, se procedió con el análisis de varianza (ANOVA), considerando como única fuente de variación la localización de la muestra en el interior del huevo del Suri en la etapa de formación de embrión.

**Tabla 6.** Análisis de varianza para carga bacteriana en membrana corioalantoídea y embrión de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. (agosto, 2020).

| Fuente          | GL | Suma de cuadrados      | Cuadrados medios      | F      | Pr > F          |
|-----------------|----|------------------------|-----------------------|--------|-----------------|
| Modelo          | 1  | 95250411648000000.000  | 95250411648000000.000 | 41.779 | < <b>0.0001</b> |
| Error           | 18 | 41037265964000000.000  | 22798481091111100.000 |        |                 |
| Total corregido | 19 | 136287677612000000.000 |                       |        |                 |

En la Tabla 6, el análisis de varianza en un solo sentido, permitió determinar que existe diferencia estadística significativa entre las partes del huevo en etapa de formación de

embrión, respecto a la carga bacteriana obtenida ( $p < 0.0001$ ), de lo cual se interpreta que por lo menos una de las partes presenta una media diferente al resto, para verificar diferencias específicas entre las mismas, se procedió con la prueba de rango múltiple de Duncan.

**Tabla 7.** Prueba de rango múltiple de Duncan para carga bacteriana en membrana corioalantoídea y embrión de huevos desechados en incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. (agosto, 2020).

| Categoría                | Media         | Grupos de Duncan |
|--------------------------|---------------|------------------|
| Embrión                  | 447700000.000 | A                |
| Membrana Corioalantoídea | 11236000.000  | B                |

Las categorías con letra diferente son estadísticamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ )

En la Tabla 7, la prueba de rango múltiple de Duncan, permitió diferenciar en forma clara dos grupos (observe la letra de grupos), el primero formado únicamente por el embrión que presenta un valor superior de carga bacteriana con 447700000.000 ( $448 \times 10^6$ ) UFC/ml, mientras que el segundo grupo formado por la membrana corioalantoídea con 11236000.000 ( $11 \times 10^6$ ) UFC/ml.

Interpretando los resultados obtenidos podemos decir que existen distintos factores relacionadas con la aparición de la muerte embrionaria, pudiendo estar relacionadas con las cargas elevadas de mesófilos aerobios en huevos que desarrollaron embrión. Según Carbajo *et al* (1997), debido a una elevada carga bacteriana se pueden presentar hemorragias en la membrana corioalantoídea produciendo muerte embrionaria, tal como lo menciona Foggin (1992), que la mayor parte de las muertes embrionarias se producen tardíamente en la última semana de incubación por lo que muchas muertes están relacionadas con infecciones bacterianas.



Chavez & Gavidia (2016), menciona que la principal causa de muerte embrionaria tanto en incubación artificial y natural de los huevos de pata criolla es la contaminación de los huevos, así como las malformaciones y la mala posición embrionarias, encontrando una mortalidad embrionaria en incubación natural del 34% y 76.27 % en incubación artificial de 778 huevos fértiles; así también, Brown *et al* (1996),realizo un estudio en la industria del avestruz en Sudáfrica, analizo 111 embriones que murieron dentro de los 10 y 14 últimos días de incubación encontrando solo el 10% del total se debió a infecciones bacterianas. Sin embargo Chang *et al* (2004), quien realizó un estudio durante la temporada de reproducción del 2000, donde se monitorio el éxito de eclosión y la mortalidad embrionaria de 724 huevos de ñandú en Argentina, menciona que la infección bacteriana pudo no haber sido la causa más importante de la falla en la incubación. Estando en desacuerdo con dicha afirmación.

Deeming (1996), investigo tres lotes de huevos de avestruz uno en África y dos en Europa de los cuales el 18% y 21% de cada lote estaban contaminados con bacteria y hongos por lo cual el considera que existe una alta incidencia de contaminación microbiana para ser considerado como un problema significativo; esta afirmación concuerda por lo encontrado en esta investigación que de un total de 38 huevos desechados, un numero de 10 huevos presentaron formación de embrión, el cual correspondería al 26 % del total de huevos examinados. En otro estudio, Chang *et al* (2001), reporta el porcentaje de mortalidad embrionaria en 37 huevos recibidos por el INTA Bariloche en dónde; se determinó que la muerte por contaminación bacteriana fue del 40% lo que equivale a 15 huevos del total, dicho estudio corrobora lo encontrado en esta investigación.

En conclusión, podemos decir que al encontrarse una alta variación de la carga mesófilos viables en el embrión, sean estos los responsables de la muerte embrionaria debido a que



estos microorganismos producen hemorragias e infecciones en los embriones, produciendo su muerte mientras se encuentran dentro del huevo.

De todo lo analizado con respecto a la Carga bacteriana diferente en las estructuras internas (Membrana de la cáscara, Albúmina, Vitelo, Membrana corioalantoídea y Embrión) de huevos desechados de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. se acepta la hipótesis planteada, ya que la carga bacteriana es diferente en las estructuras internas de los huevos desechados.

#### **4.2 Aislamiento e identificación bacterias presentes en diferentes estructuras internas (Membrana de la cascara, Albúmina, Vitelo, Membrana corioalantoídea y Embrión) de huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*.**

**Tabla 8.** Frecuencia de bacterias en diferentes estructuras internas (membrana de la cascara, albúmina, vitelo, membrana corioalantoídea y embrión) de huevos desechados durante el periodo de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. (agosto, 2020).

| Estructura               | Especie bacteriana           | N  | %      |
|--------------------------|------------------------------|----|--------|
| Membrana de la cascara   | <i>Bacillus sp.</i>          | 1  | 2.63   |
|                          | <i>Eschericha coli</i>       | 25 | 65.79  |
|                          | <i>Staphylococcus aureus</i> | 8  | 21.05  |
|                          | <i>Pseudomonas sp.</i>       | 4  | 10.53  |
|                          | Total                        | 38 | 100.00 |
| Membrana corioalantoídea | <i>Eschericha coli</i>       | 5  | 45.45  |
|                          | <i>Pseudomonas sp.</i>       | 4  | 36.36  |
|                          | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2  | 18.18  |
|                          | Total                        | 11 | 100.00 |
| Albumina                 | <i>Bacillus sp.</i>          | 1  | 2.63   |



|         |                              |    |        |
|---------|------------------------------|----|--------|
|         | <i>Eschericha coli</i>       | 25 | 65.79  |
|         | <i>Staphylococcus aureus</i> | 8  | 21.05  |
|         | <i>Pseudomonas sp.</i>       | 4  | 10.53  |
|         | Total                        | 38 | 100.00 |
| Vitelo  | <i>Bacillus sp.</i>          | 1  | 2.63   |
|         | <i>Eschericha coli</i>       | 25 | 65.79  |
|         | <i>Staphylococcus aureus</i> | 8  | 21.05  |
|         | <i>Pseudomonas sp.</i>       | 4  | 10.53  |
|         | Total                        | 38 | 100.00 |
| Embrión | <i>Eschericha coli</i>       | 5  | 45.45  |
|         | <i>Pseudomonas sp.</i>       | 4  | 36.36  |
|         | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2  | 18.18  |
|         | Total                        | 11 | 100.00 |

Fuente: elaboración propia

En la tabla 8 se muestra el porcentaje de la frecuencia de bacterias presentes en las estructuras internas de 38 huevos de Suri, encontrando una relación de igualdad de porcentaje de frecuencia en la membrana de la cáscara, albumina y vitelo. Donde se determinó las siguientes especies; *Eschericha coli* con un 66 %, seguido en proporción por *Staphylococcus aureus* con un 21 %, *Pseudomonas sp.* con un 10 % y finalmente *Bacillus sp.* con un 3 %. Sin embargo, el porcentaje de la frecuencia de bacterias encontradas en la membrana corioalantoídea y el embrión son diferentes en donde se determinó las siguientes especies; *Eschericha coli* con un 46%, seguido en proporción por *Pseudomonas sp.* con un 36 % y finalmente *Staphylococcus aureus* con un 18 %.(Cubillos et al., 1981), obtuvo un resultado similar de un total de 115 huevos de ganso. Entre las bacterias aisladas de mayor presencia fue: *Eschericha coli* con un 46.34 % seguido por *Staphylococcus* con un 31.70 % y *Alcaligenes* con un 19.51 %. Siendo estos datos similares a los encontrados en esta investigación a excepción del genero *Alcaligenes* el cual no se encontró en los huevos de suri.



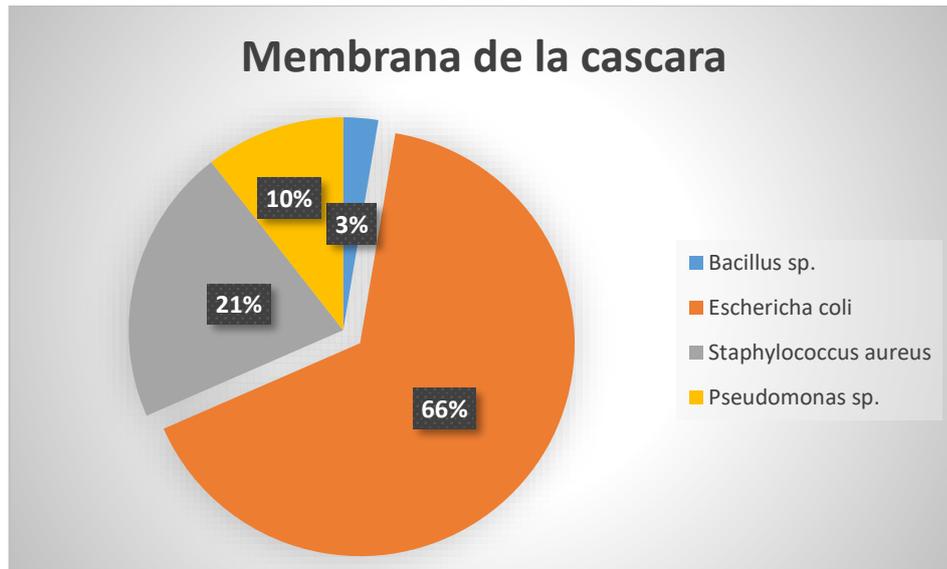
El porcentaje de especies aisladas en diferentes huevos de aves por Bruce & Drysdale (1994), señalan que para el género *Staphylococcus*, se tiene un 2.5 % en huevos de pata, 66 % e huevos de aves acuáticas, 31.5 % en huevos de gallina y un 71.4 % en huevos de pava. Para el género *Pseudomonas* se tiene un 56 % en huevos de pata, 0% en huevos de aves acuáticas, 2.5 % en huevos de gallina y 1.5 % en huevos de pava y para el género *Bacillus* se tiene un 8.6 % en huevos de pata, 0.9 % en huevos de aves acuáticas, 1.2 % en huevos de gallina y finalmente 1.6 % en huevos de pava. De acuerdo a estos resultados podemos mencionar que el porcentaje de aislamiento del género *Staphylococcus* en huevos de suri desechados con un 21% y 18 % es mayor al de la pata, aves acuáticas y gallina y menor que el de la pava y aproximadamente cercana al de la gallina los cuales fueron mencionados anteriormente. En caso del género *Pseudomonas* en huevos de suri con un 10 y 36 % podemos decir que el porcentaje de aislamiento en los huevos de pata es mayor a los encontrados en los huevos de suri desechados y estos a su vez son mayores a los de los huevos de aves acuáticas, gallina y pava. Por último, el género *Bacillus* en huevos de suri con un 3 % el cual es menor al de la pata y la pava y mayor al de las aves acuáticas y la gallina.

Se determinó que *Escherichia coli* es la especie bacteriana más frecuente en los huevos de suri desechados con un porcentaje de frecuencia de 65.79% en la membrana de la cascara. Se encontró la misma especie en la membrana corioalantoídea con un 45.45%, en la albumina del huevo con un 65.79%, en el vitelo con un 65.79% y en el embrión se determinó la presencia la misma bacteria con un 45.45%. Respalda este resultado Bruce & Drysdale (1994), quienes indica que la microbiota de los diferentes huevos de aves se encuentran en mayor proporción las enterobacterias, siendo el porcentaje el siguiente; huevos de pata con un 65.4 % , huevos de aves acuáticas con un 66 % , huevos de gallina



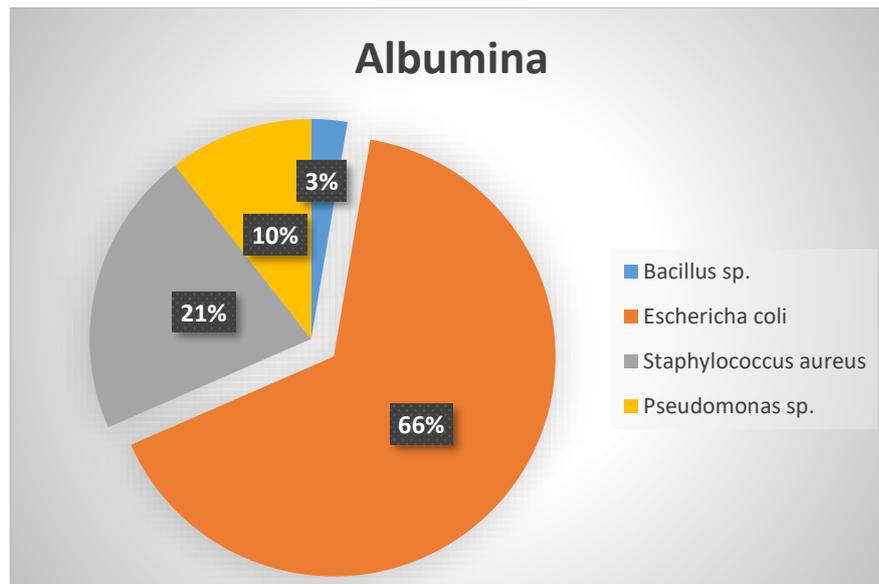
31.5 % y en los huevos de pava 71.4 %, además podemos mencionar lo hallado por Chang *et al* (2001), quien también encontró un porcentaje de frecuencia de *Eschericha coli* con un 21.3 % en huevos de choique. En un estudio reciente por Rubaiey *et al* (2020), quienes encontraron que la especie bacteriana de mayor prevalencia pertenecía a la familia enterobacteriaceae, principalmente *Eschericha coli*. Por otro lado, Cabassi *et al* (2004), en sus investigaciones microbiológicas mostraron aislamiento bacteriano en 105 huevos de avestruz , equivalentes al 19.3 % de 543 huevos en Italia, encontrando una alta prevalencia de enterobacterias en la albúmina y la yema, este resultado apoya lo encontrado en esta investigación que encontró una alta frecuencia de *Eschereicha coli*, el cual pertenece a la familia enterobacteriaceae.

En general, se obtuvo que la bacteria de mayor presencia en las diferentes estructuras internas de los huevos fue *Eschericha coli* mientras que las especies restantes presentaron una menor presencia, siendo las de menor presencia *Bacillus sp*.



**Figura 14.** Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en la membrana de la cascara de los huevos desechados de suri, Puno 2020.

En la figura 14 se muestra el porcentaje de frecuencia de bacterias presentes en la membrana de la cascara del huevo del Suri, en donde podemos apreciar que tenemos según porcentaje de frecuencia a las bacterias *Escherichia coli* con 66% seguido por *Staphylococcus aureus* con un 21%, *Pseudomonas sp.* con 10% y por ultimo *Bacillus sp.* con 3%. Estos resultados son comparados con los Hallados por; Cubillos *et al* (1981), quienes aislaron e identificaron según porcentaje en la membrana de la cascara de huevos de ganso en un primer miraje *Escherichia coli* con 33.33%, *Staphylococcus aureus* con 33.33%, *Streptococcus* 33.33% y *Proteus* con 33.33%. Los resultados son menores y proporcionalmente iguales por especie. Sin embargo, algunas especies encontradas son iguales a los hallados en esta investigación.

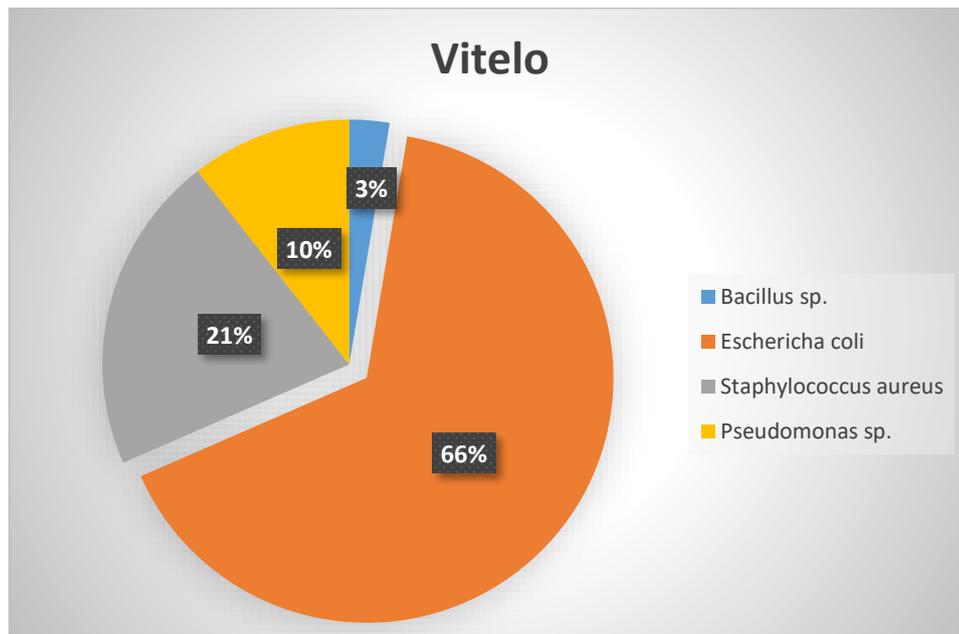


**Figura 15.** Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en la albumina de los huevos desechados de suri, Puno 2020.

En la figura 15 se muestra el porcentaje de frecuencia de bacterias presentes en la albumina del huevo del Suri en donde podemos apreciar que tenemos según porcentaje de frecuencia a las bacterias *Escherichia coli* con 66%, seguido de *Staphylococcus aureus* con 21%, *Pseudomonas sp.* con 10% y *Bacillus sp.* con un 3%. Estos resultados son comparados con los hallados por Ghalib *et al* (2020) quien encontró en su estudio del contenido de 50 huevos de gallina, un número de 19 bacterias en total, las cuales tienen una distribución de frecuencia: *Escherichia coli* con un 6%, *Staphylococcus aureus* con un 14%, *Enterococcus faecalis* con un 8%, *Enterobacter* con un 2% y *Pseudomonas sp.* con un 14%. Podemos ver que existe una marcada diferencia entre el porcentaje de la bacteria *Escherichia coli* en huevos de suri con un 66% comparado con solo un 6% encontrados en los huevos de gallina, también podemos comparar las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas sp.* cuyo porcentaje en la diferencia de frecuencias no es muy alto en huevos de suri con un 21 y 10% en comparación de los

huevos de gallina con un 14 y 14 % respectivamente, además no se encontró los géneros *Enterococcus* , *Enterobacter* en los huevos de suri.

Por lo que podemos concluir que las bacterias comunes encontradas en la albumina de ambos huevos son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas sp.*

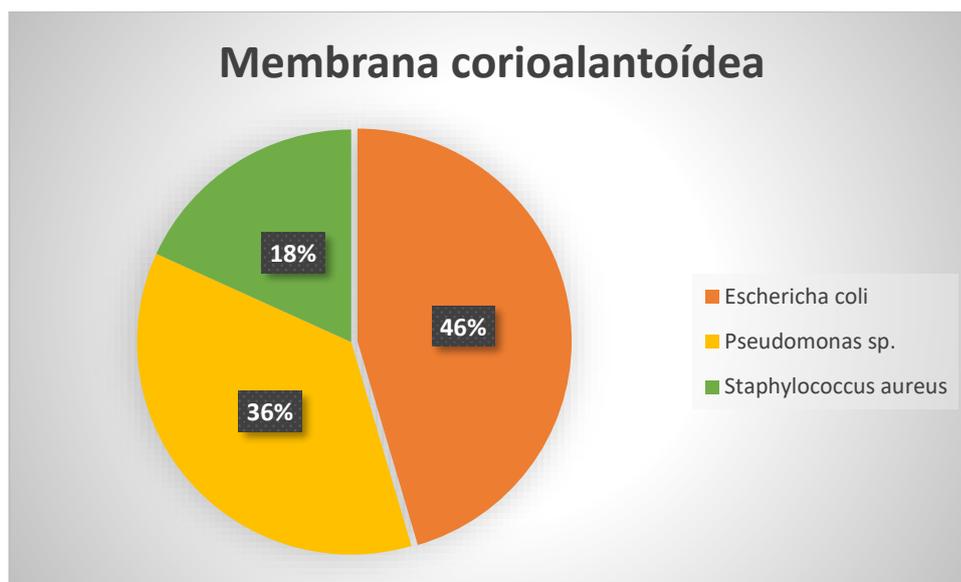


**Figura 16.** Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en el vitelo de los huevos desechados de suri, Puno 2020.

En la figura 16 se muestra el porcentaje de frecuencia de bacterias presentes en el vitelo de los huevos del Suri, en donde podemos apreciar que tenemos según porcentaje de frecuencia a las bacterias *Escherichia coli* con 66%, seguido de *Staphylococcus aureus* con 21%, *Pseudomonas sp.* Con 10% y *Bacillus sp.* con un 3%. estos resultados son comparados con los hallados por Loaiza *et al* (2011), en su estudio para buscar salmonella y otras bacterias contaminantes en huevos comerciales en donde se muestra el porcentaje de frecuencia de bacterias aisladas en la yema y la clara de 268 huevos de los cuales tenemos *Bacillus sp.* Con un 23.5 %, *Escherichia coli* con un 7.1 %, *Pseudomonas sp.*, con un 21.26 % y *Staphylococcus aureus* con un 2.4 % y otras bacterias con el 45.74 % restante. En donde podemos observar que existe una alta diferencia en la bacteria *Bacillus*

*sp.*, según esta investigación en donde el porcentaje de frecuencia es de un 3 % y en comparación con los huevos comerciales que es un 23.5 %, siendo este resultado mucho mayor al igual que *Pseudomonas sp.*, con un 21.26 % mayor a la yema o vitelo de los huevos de suri con un 10 %, sin embargo, se pudo observar que el porcentaje de frecuencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* es mayor en los huevos de suri con un 66 % y 21 % en comparación con tan solo un 7.1% y 2.4 % en los huevos comerciales

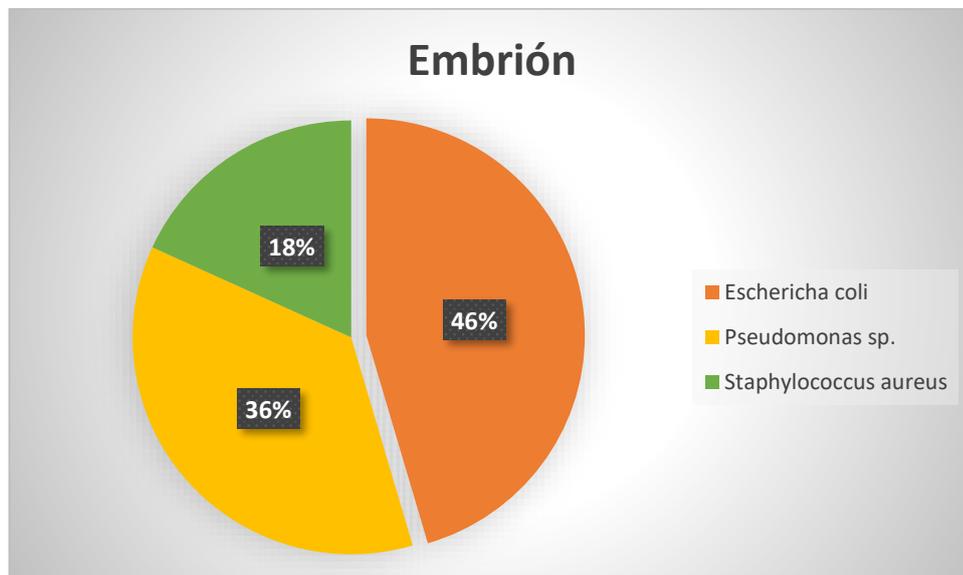
por lo que podemos concluir que se encontraron las mismas especies bacterianas tanto en el huevo de suri como en los huevos comerciales, pero variando el porcentaje de frecuencia.



**Figura 17.** Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en la membrana corioalantoídea de los huevos desechados de suri, Puno 2020

En la figura 17 se muestra el porcentaje de frecuencia de bacterias presentes en la membrana corioalantoídea de huevo del Suri en donde podemos apreciar que tenemos según porcentaje de frecuencia a las bacterias *Escherichia coli* con 46%, seguido de *Pseudomonas sp.* con un 36 % y *Staphylococcus aureus* con 18 %. Según los resultados reportados por, Cubillos *et al* (1981), en donde se aisló 42 cepas en la membrana

corioalantoídea de los huevos de ganso de acuerdo al siguiente orden; *Eschericha coli* con 26.2 %, *Staphylococcus sp.*, con un 21.4 %, *Bacillus sp.*, con un 11.9% y finalmente *Pseudomonas sp.*, con un 4.7 % y el 35 % restante por otras bacterias. Según estos resultados podemos comparar con los encontrados en esta investigación en donde el porcentaje de *Eschericha coli* y *Pseudomonas sp.*, es mayor en la membrana corioalantoídea de los huevos del suri con un 46 % y 36 %, en comparación con la membrana corioalantoídea de los huevos de ganso con un 26.2 % y 4.7 % mientras que *Staphylococcus sp.*, es menor en la membrana corioalantoídea de los huevos de suri con un 18 %, en comparación con la membrana corioalantoídea de los huevos de ganso con un 21.4 % además en este estudio no se encontró presencia de *Bacillus sp.*, en la membrana corioalantoídea de los huevos de suri.



**Figura 18.** Porcentaje de frecuencia de las diferentes bacterias aisladas e identificadas en el embrión de los huevos desechados de suri, Puno 2020.

En la figura 18 se muestra el porcentaje de frecuencia de bacterias presentes en el embrión del huevo del Suri en donde podemos apreciar que tenemos según porcentaje de frecuencia a las bacterias *Escherichia coli* con 46%, seguido de *Pseudomonas sp.* con un



36 % y *Staphylococcus aureus* con 18 %. Según los resultados reportados por, Cubillos *et al* (1981), en donde se aisló 16 cepas en el embrión de los huevos de ganso de acuerdo al siguiente orden; *Escherichia coli* con 37.5 %, *Staphylococcus sp.*, con un 18.75 %, *Bacillus sp.*, con un 6.25 % y finalmente *Pseudomonas sp.*, con un 12.5 % y el 25 % *Alcaligenes sp.*, y *Shiguella sp.*, según estos resultados podemos observar que *Escherichia coli* en ambos embriones tanto en suri como en ganso son elevados con un 46 % y 37.5 % respectivamente, seguido por *Pseudomonas sp.*, con un 36 % y 12.5 % y finalmente *Staphylococcus sp* con un margen ligeramente igual con un 18 % y 18.75%, no se encontraron *Bacillus sp.*, *Alcaligenes sp.*, y *Shiguella sp.*, en los resultados obtenidos en embriones de huevos de suri, Lábaque *et al* (2003), menciona que aisló 7 cepas de bacterias en huevos fértiles descartados durante la incubación artificial de *Rhea americana* con un porcentaje de aislamiento de *Pseudomona sp.*, con un 42.85 %, siendo este resultado mayor al encontrado en esta investigación con un 36 %.

De acuerdo a los resultados podemos concluir que la mayoría de los autores encontraron especies similares en los embriones de huevos de diferentes especies de aves, pero con diferencia en los porcentajes.

De todo lo analizado con respecto a que existen diferentes tipos de bacterias en las estructuras internas (Membrana de la cáscara, Albúmina, Vitelo, Membrana corioalantoídea y Embrión) de huevos desechados de incubación natural en semi cautiverio de *Rhea pennata*. se acepta la hipótesis planteada, ya que se pudieron aislar e identificar diferentes tipos de bacterias en las estructuras internas de los huevos del suri.



## V. CONCLUSIONES

- Se determinó una carga bacteriana media de  $(504 \times 10^6)$  UFC/ml en la membrana de la cáscara, en la albumina y el vitelo se obtuvo una carga bacteriana media de  $(166 \times 10^6)$  UFC/ml y  $(163 \times 10^6)$  UFC/ml respectivamente, el análisis estadístico señala que la mayor contaminación bacteriana se presenta en la membrana de la cascara ( $p < 0.0001$ ). En el embrión se determinó un valor de carga con  $(447 \times 10^6)$  UFC/ml, en la membrana corioalantoídea se obtuvo una carga de  $(11 \times 10^6)$  UFC/ml, el análisis estadístico señala que la mayor contaminación bacteriana se presenta en el embrión ( $p < 0.0001$ ).
- Se aisló e identificó cuatro tipos de bacterias, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* y se determinó que la especie bacteriana más frecuente en las cinco estructuras internas del huevo del Suri analizadas fue *Escherichia coli*, en la membrana de la cáscara con 65.79%, en la membrana corioalantoidea 45.45%, en la albumina del huevo 65.79%, en el vitelo 65.79% y embrión 45.45%.



## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios sobre los tipos de especies de hongos que se encuentran presente en los huevos desechados de suri, debido a que no se posee información acerca de estos estudios y que pueden ser determinantes para adoptar medidas sanitarias no solo enfocadas en bacterias.
- Se recomienda realizar estudios acerca de la carga bacteriana de suelos en los nidos, debido a que en los resultados se observó que *Escherichia coli* está presente en la mayoría de los casos de huevos contaminados en el periodo de incubación natural.
- Se recomienda realizar un estudio para determinar las causas de contaminación por *Escherichia coli* y su relación con el manejo adecuado de los huevos y ambientes de reproducción con respecto a su limpieza y desinfección y número de individuos por área y de ser posible tomar como referencia la edad de los individuos respecto a la experiencia reproductiva.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akbar, A., Anal, A. K., Chaemsanit, S., & Kumar Anal, A. (2015). Isolation of total aerobic and pathogenic bacteria from table eggs and its contents Detection of mycotoxin in poultry feeds, and its bio-control strategies View project Occurrence and Diversity of Marine Yeast in the Mangrove Ecosystem of Lasbela Coast Vi. *Food and Applied Bioscience Journal*, 3(1), 1–9.  
<https://www.researchgate.net/publication/271827051>
- AL-Rubaiey, M. G. A., ALtaai, N. A., Mounam, M. A. W. A., & Mahmood, M. M. (2020). Study of bacterial contamination of defected eggshells and egg contents in Baghdad city. *Plant Archives*, 20, 2306–2308.
- Allan Larson , Cleveland P. Hickman Jr. , David J. Eisenhour , Helen I´Anson, L. S. R. y S. K. (2009). *Principios Integrales de Zoología* (14th ed.). McGraw-Hill.
- Brand, Z., Cloete, S. W. P., Malecki, I. A., & Brown, C. R. (2017). Ostrich (*Struthio camelus*) embryonic development from 7 to 42 days of incubation. *British Poultry Science*, 58(2), 139–143. <https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1259529>
- Brown, C. R., Peinke, D., & Loveridge, A. (1996). Mortality in near-term ostrich embryos during artificial incubation. *British Poultry Science*, 37(1), 73–85.  
<https://doi.org/10.1080/00071669608417838>
- Bruce, J., & Drysdale, E. M. (1994). Trans-shell transmission. In *Microbiology of the Avian Egg* (pp. 63–91). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3060-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3060-2_4)
- Cabassi, C. S., Taddei, S., Predari, G., Galvani, G., Ghidini, F., Schiano, E., & Cavirani, S. (2004). Bacteriologic findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failures. *Avian Diseases*, 48(3), 716–722.  
<https://doi.org/10.1637/7142>
- Campuzano F, S., Mejía Flórez, D., Madero Ibarra, C., & Pabón Sánchez, P. (2015). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *Nova*, 13(23), 81.  
<https://doi.org/10.22490/24629448.1708>
- Carbajo, E. F. Castello, J. Castello, A gurri, M. Marin, J. mesia, J. Sales, D. S. (1997).



- Cria de Avestruces Emues y Ñandues* (2a. edición). Editorial Grinver.
- Carrillo, L., & Audisio, M.-C. (2007). *Manual de microbiología de alimentos* (primera ed). Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU, SS Jujuy.
- Carroll, K., Morse, S., Mietzner, T., & Miller, S. (2016). Jawetz, Melnick Y Adelberg Microbiología Médica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (27a. edición, Vol. 53, Issue 9). McGRAW-HILL/Interamericana Editores, S.A.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Castañeda Briones, M. T. (2013). *Microbiología Aplicada Manual de Laboratorio División de Ciencias Básicas e Ingeniería Operativa de Ciencias Exactas Contenido*.  
[http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/1746/Microbiologia\\_aplicada\\_manual\\_de\\_laboratorio.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://zaloamati.azc.uam.mx/bitstream/handle/11191/1746/Microbiologia_aplicada_manual_de_laboratorio.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Chang Reissig, E., Terzolo, H., Armando, S., & Rogé, A. (2004a). Hatching success and embryonic mortality on lesser rhea (*Pterocnemia pennata*) farms in northern Patagonia, Argentina. *British Poultry Science*, 45(4), 471–475.  
<https://doi.org/10.1080/00071680412331286181>
- Chang Reissig, E., Terzolo, H., Armando, S., & Rogé, A. (2004b). Hatching success and embryonic mortality on lesser rhea (*Pterocnemia pennata*) farms in northern Patagonia, Argentina. *British Poultry Science*, 45(4), 471–475.  
<https://doi.org/10.1080/00071680412331286181>
- Chang Reissig, Elizabeth, Robles, C. A., Olaechea, F. V., & Willems, P. M. (2001). Determinación De Parámetros Fisiológicos Normales y Principales Problemas Sanitarios de Choiques criados en Granjas. *INTA EEA Bariloche*, 1–18.
- Cubillos, A., Montes, L., Montecinos, M. I., & Alvarez, C. (1981). Estudio de Causales de Eliminación en Huevos Incubados de Ganso. *Zoonoses and Public Health*, 28, 111–117.
- Deeming, D. C. (1995a). Factors affecting hatchability during commercial incubation of Ostrich (*Struthio camelus*) eggs. *British Poultry Science*, 36(1), 51–65.  
<https://doi.org/10.1080/00071669508417752>



- Deeming, D. C. (1995b). The hatching sequence of Ostrich (*Struthio camelus*) embryos with notes on development as observed by candling. *British Poultry Science*, 36(1), 67–78. <https://doi.org/10.1080/00071669508417753>
- Deeming, D. C. (1996). Microbial spoilage of ostrich (*struthio catnelus*) eggs. *British Poultry Science*, 37(3), 689–693. <https://doi.org/10.1080/00071669608417898>
- Dominguez, F. A. (2012). *Aspectos Microbiológicos del Huevo y sus Derivados*. Universidad Autonoma de Mexico.
- Foggin, C. M. (1992). *Pathology of Ostriches eggs and investigation problems*. Topaz.
- Ghalib, M., Al-Rubaiey, A., Altaai, N. A., Mounam, M. A. W. A., & Mahmood, M. M. (2020). *Study of Bacterial Contamination of Defected Eggshells and Egg Contents in Baghdad City*.
- Harvey, R., Cornelissen, C., & Fisher, B. (2013). lippincott's illustrated reviews Microbiology. In R. Harvey (Ed.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (third edit, Vol. 53, Issue 9). Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business 351. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- ICMSF / International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2006). <https://www.icmsf.org/>
- Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., Winn, W., Allen, S., & Jada, W. (2008). *Koneman Diagnóstico microbiológico* (sexta edic). Medica Panamericana S.A.
- Lábaque, M. C., Navarro, J. L., & Martella, M. B. (2003). Microbial contamination of artificially incubated Greater Rhea (*Rhea americana*) eggs. *British Poultry Science*, 44(3), 355–358. <https://doi.org/10.1080/00071660310005198319>
- Loaiza J, Sánchez M, Henao S, C.-C. (2011). Detección de bacterias contaminantes en huevos para consumo en Medellín y su área Metropolitana. *Rev CES Med Vet Zotec*, 6(2)(Julio-Diciembre), 20–28.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Brock Biología de Los Microorganismos* (P. HALL (Ed.); Decima ed).
- Madigan, M. T., & Clark, D. P. (2009). *Brock Biología de Los microorganismos*



- (duodécima). Pearson Education S.A.
- Mendo, R. M. (2003). *Medios de cultivo en Microbiología* (5a edición). ¿Ediciones Laborales SRL.
- MINSA/DIGESA. (2008). *NTS N° - MINSA/DIGESA-V.01. Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de la Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano* (p. 24).
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & A, P. (2009). Microbiología Medica. In *Journal of Visual Languages & Computing* (Sexta ed). [https://www.m-culture.go.th/mculture\\_th/download/king9/Glossary\\_about\\_HM\\_King\\_Bhumibol\\_Adulyadej's\\_Funeral.pdf](https://www.m-culture.go.th/mculture_th/download/king9/Glossary_about_HM_King_Bhumibol_Adulyadej's_Funeral.pdf)
- O'Leary, J., & Busta, F. F. (1974). Effect of food components on growth of *Baccillus sterothermophilus*. *Jornal of Food Science*, 39, 1157–1160.
- Ortiz Chavez, H. H., & Cumpa Gavidia, M. E. (2016). *Natural Y Artificial De Huevos De Pata Criolla Causes of Embryonic Mortality in the Natural and Artificial*. 77(1), 69–76.
- PEBLT. (2017). Conservación del Suri ( *Rhea pennata*), avances y logros. In *PEBLT* (1a. edicio, Issue 1ra. ed.). Editorial Altiplano E.I.R.L. [www.pelt.gob.pe](http://www.pelt.gob.pe)
- PELT. (2008). *Avances en el Manejo y Conservacion del Suri (Rhea pennata)* ”.
- Pereira Zamora, M., Hernández Chavarría, F., & Wong González, E. (2007). Penetración de *Vibrio mimicus* a través de la cáscara del huevo de tortuga lora (*Lepidochelys olivacea*). *Agronomía Mesoamericana*, 18(2), 247. <https://doi.org/10.15517/am.v18i2.5054>
- Pinto, P. U. (2017). *Micro-organismos indicadores*. 1–14.
- Sánchez, M. (2013). Determinación de la prevalencia de enterobacterias del género *Salmonella* spp. en huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la provincia del Tungurahua. In *Tesis Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. <https://es.scribd.com/document/441800881/Tesis-68-Medicina-Veterinaria-y-Zootecnia-CD-436-pdf>
- SERFOR. (2015). *Plan Nacional para la conservacion de Suri (Rhea pennata)*.



<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Solís, C. (2016). “*Microbiota en Huevos y Derivados: Identificación y Desarrollo*”

*Carmen Neira Solís*. <https://es.scribd.com/document/408206925/TFM-CarmenNeiraSolis-docx>

Tortora, G. J., Funke, B. r., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9a. edición). Editorial Médica Panamericana , S.A.

Vásquez, V., Gerardo, A. J., Jiménez, L. A., Leidyn, D., & Ríos, M. A. (2018). Evaluation of the Bacteriological Quality of Fresh Cheeses From Cajamarca. *Ecología Aplicada*, 17(1), 46–51.



## ANEXOS

**Tabla 9.** Matriz básica de datos de carga bacteriana (UFC/ml)

| Numero de Muestra | Membrana de la cascara | Membrana corioalantoidea | Albumina o Clara | Vitelo o Yema | Embrión   |
|-------------------|------------------------|--------------------------|------------------|---------------|-----------|
| 1                 | 63000000               |                          | 53000000         | 30000000      |           |
| 2                 | 256000000              |                          | 252000000        | 252000000     |           |
| 3                 | 55000000               |                          | 40000000         | 28000000      |           |
| 4                 | 456000000              |                          | 220000000        | 220000000     |           |
| 5                 | 750000000              | 10380000                 | 10380000         | 10380000      | 532000000 |
| 6                 | 724000000              |                          | 111000000        | 111000000     |           |
| 7                 | 689000000              | 10200000                 | 10200000         | 10200000      | 479000000 |
| 8                 | 64000000               | 4000000                  | 43000000         | 33000000      | 44000000  |
| 9                 | 542000000              |                          | 244000000        | 244000000     |           |
| 10                | 64000000               |                          | 39000000         | 28000000      |           |
| 11                | 834000000              | 20000000                 | 20000000         | 20000000      | 642000000 |
| 12                | 634000000              |                          | 350000000        | 350000000     |           |
| 13                | 552000000              |                          | 232000000        | 232000000     |           |
| 14                | 65000000               | 5000000                  | 53000000         | 30000000      | 65000000  |
| 15                | 389000000              |                          | 215000000        | 215000000     |           |
| 16                | 728000000              |                          | 375000000        | 375000000     |           |
| 17                | 475000000              |                          | 200000000        | 200000000     |           |
| 18                | 60000000               |                          | 41000000         | 29000000      |           |
| 19                | 586000000              |                          | 299000000        | 299000000     |           |
| 20                | 724000000              | 11400000                 | 11400000         | 11400000      | 524000000 |
| 21                | 579000000              |                          | 254000000        | 254000000     |           |
| 22                | 720000000              |                          | 300000000        | 300000000     |           |
| 23                | 560000000              |                          | 230000000        | 230000000     |           |
| 24                | 820000000              | 19190000                 | 19190000         | 19190000      | 620000000 |
| 25                | 50000000               |                          | 37000000         | 27000000      |           |
| 26                | 699000000              |                          | 350000000        | 350000000     |           |
| 27                | 734000000              |                          | 326000000        | 326000000     |           |
| 28                | 752000000              | 10100000                 | 10100000         | 10100000      | 552000000 |
| 29                | 578000000              |                          | 276000000        | 276000000     |           |
| 30                | 685000000              |                          | 354000000        | 354000000     |           |
| 31                | 645000000              |                          | 327000000        | 327000000     |           |
| 32                | 699000000              | 10900000                 | 10900000         | 10900000      | 489000000 |
| 33                | 724000000              |                          | 351000000        | 351000000     |           |
| 34                | 65000000               |                          | 48000000         | 30000000      |           |
| 35                | 590000000              |                          | 289000000        | 289000000     |           |
| 36                | 54000000               |                          | 40000000         | 29000000      |           |
| 37                | 725000000              | 11190000                 | 11190000         | 11190000      | 530000000 |
| 38                | 760000000              |                          | 254000000        | 254000000     |           |

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 10.** Matriz básica de datos de presencia bacteriana

| Numero de Huevo | Membrana de la cascara       | Membrana corioalantoidea     | Albumina                     | Vitelo                       | Embrión                      |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1               | <i>Bacillus sp.</i>          |                              | <i>Bacillus sp.</i>          | <i>Bacillus sp.</i>          |                              |
| 2               | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 3               | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              |
| 4               | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 5               | <i>Escherichia coli</i>      |
| 6               | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              |
| 7               | <i>Pseudomonas sp.</i>       |
| 8               | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 9               | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 10              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 11              | <i>Pseudomonas sp.</i>       |
| 12              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 13              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 14              | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 15              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 16              | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              |
| 17              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 18              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 19              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 20              | <i>Escherichia coli</i>      |
| 21              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 22              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 23              | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              |
| 24              | <i>Pseudomonas sp.</i>       |
| 25              | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              |
| 26              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 27              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 28              | <i>Escherichia coli</i>      |
| 29              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 30              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 31              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 32              | <i>Pseudomonas sp.</i>       |
| 33              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 34              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 35              | <i>Escherichia coli</i>      |                              | <i>Escherichia coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>      |                              |
| 36              | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |                              |
| 37              | <i>Escherichia coli</i>      |
| 38              | <i>Escherichia coli</i>      |

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 11.** Microbiota de los huevos en diferentes aves según porcentaje de aislamiento.

| Microorganismos                   | Pata | Pata | Aves acuáticas | Gallina | Gallina | Pava |
|-----------------------------------|------|------|----------------|---------|---------|------|
| <i>Enterobacterias</i>            | 65.4 | 40.0 | 66.0           | 11.8    | 31.5    | 71.4 |
| <i>Staphylococcus</i>             | 2.5  | 4    | 11.4           | 23.0    | 9.2     | 71.4 |
| <i>Microccus</i>                  | 1.2  | 0    | 21.3           | 63.8    | 34.6    | 0    |
| <i>Streptococcus/Enterococcus</i> | 0    | 0    | 0              | 1.2     | 15.3    | 8.5  |
| <i>pseudomonas</i>                | 16.0 | 56.0 | 0              | 0       | 2.5     | 1.5  |
| <i>Acinetobacter</i>              | 6.2  | 0    | 0              | 0       | 0       | 0    |
| <i>Bacillus</i>                   | 8.6  | 0    | 0.9            | 0       | 1.2     | 3.9  |
| <i>Mohos</i>                      | 0    | 0    | 0              | 0       | 0.2     | 1.6  |
| <i>Sin identificar</i>            | 0    | 0    | 0              | 0       | 5.5     | 5.4  |

**Fuente:** Bruce y Drysdale, 1994.

**Tabla 12.** Distribución de la frecuencia de los microorganismos aislados de la cascara de los huevos rotos examinados (50 huevos).

| Isolated organism            | N°.of isolates | %    |
|------------------------------|----------------|------|
| <i>E. coli</i>               | 9              | 18 % |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 9              | 18 % |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 3              | 6 %  |
| <i>Enterobacter</i>          | 2              | 4 %  |
| <b>Total</b>                 | 23             | 46 % |

**Fuente :** (Ghalib et al., 2020)

**Tabla 13.** Distribución de frecuencia de microorganismos aislados del contenido de los huevos (50 huevos).

| ISOLATED ORGANISM            | N°. OF ISOLATES | %    |
|------------------------------|-----------------|------|
| <i>Escherichia coli</i>      | 3               | 6 %  |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 7               | 14 % |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 4               | 8 %  |
| <i>Enterobacter</i>          | 1               | 2 %  |
| <i>Pseudomonas spp.</i>      | 4               | 14 % |
| <b>Total</b>                 | 19              | 44 % |

**Fuente:** (Ghalib et al., 2020)

**Tabla 14.** Diagnostico bacteriológico de 27 huevos de choique que presentaron contaminación.

| Nro. De cepas aisladas (n=47) | DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO                       |
|-------------------------------|--|
| 5                             | <i>Salmonela anatum</i>                          |
| 1                             | <i>Salmonela cerro</i>                           |
| 1                             | <i>Salmonela sp.</i>                             |
| 10                            | <i>Escherichia coli</i>                          |
| 6                             | <i>Pseudomona aeruginosa</i>                     |
| 1                             | <i>Pseudomona pseudoalcaligenes</i>              |
| 3                             | <i>Pseudomona alcaligenes</i>                    |
| 1                             | <i>Pseudomona diminuta</i>                       |
| 5                             | <i>Klebsiella pseumoniae</i>                     |
| 1                             | <i>Bacillus spp.</i>                             |
| 1                             | <i>Citrobacter freundii</i>                      |
| 2                             | <i>Enterobacter spp.</i>                         |
| 1                             | <i>Enterobacteria grupo Providencia spp</i>      |
| 1                             | <i>Enterococcus avium</i>                        |
| 2                             | <i>Enterococcus avium</i>                        |
| 1                             | <i>Enterococcus sp</i>                           |
| 1                             | <i>Corynebacterium diphtheriae tipo ulcerans</i> |
| 1                             | <i>Staphylococcus aureus</i>                     |
| 1                             | <i>Staphylococcus spp</i>                        |
| 1                             | <i>Kurthia spp</i>                               |
| 1                             | <i>Agrobacterium</i>                             |

**Fuente:** CT – 394. INTA EEA Bariloche 2001.

**Tabla 15.** Frecuencia de presentación de microorganismos en 41 huevos desechados durante el proceso de incubación

| Microorganismos aislados   | N° | %     |
|----------------------------|----|-------|
| <i>Eschericha coli</i>     | 19 | 46.34 |
| <i>Staphylococcus sp.</i>  | 13 | 31.70 |
| <i>Alcaligenes sp.</i>     | 8  | 19.51 |
| <i>Bacillus sp.</i>        | 7  | 17.07 |
| <i>Streptococcus sp</i>    | 7  | 17.07 |
| <i>Pseudomonas sp</i>      | 4  | 9.75  |
| <i>Micrococcus sp.</i>     | 3  | 7.31  |
| <i>Corynebacterium sp.</i> | 3  | 7.31  |
| <i>Shiguella sp.</i>       | 2  | 4.87  |
| <i>Arizona sp</i>          | 1  | 2.43  |
| <i>Citrobacter sp.</i>     | 1  | 2.43  |
| <i>Proteus sp.</i>         | 1  | 2.43  |

**Fuente:** (Cubillos et al., 1981)

**Tabla 16.** Distribución de microorganismos aislados en diferentes estructuras del huevo al primer miraje.

| Cepas aisladas          | Total | Estructura del huevo   |       |          |       |        |        |
|-------------------------|-------|------------------------|-------|----------|-------|--------|--------|
|                         |       | Membrana de la cascara |       | Albumina |       | Vitelo |        |
|                         | N°    | N°                     | %     | N°       | %     | N°     | %      |
| <i>Escherichia coli</i> | 6     | 2                      | 33.33 | 2        | 33.33 | 2      | 33.33  |
| <i>Staphylococcus</i>   | 3     | 1                      | 33.33 | 1        | 33.33 | 1      | 33.33  |
| <i>Streptococcus</i>    | 3     | 1                      | 33.33 | 1        | 33.33 | 1      | 33.33  |
| <i>proteus</i>          | 3     | 1                      | 33.33 | 1        | 33.33 | 1      | 33.33  |
| <i>Corynebacterium</i>  | 1     | -                      | -     | -        | -     | -      | 100.00 |

**Fuente:** (Cubillos et al., 1981)

**Tabla 17.** Distribución de microorganismos aislados en diferentes estructuras del huevo al segundo miraje.

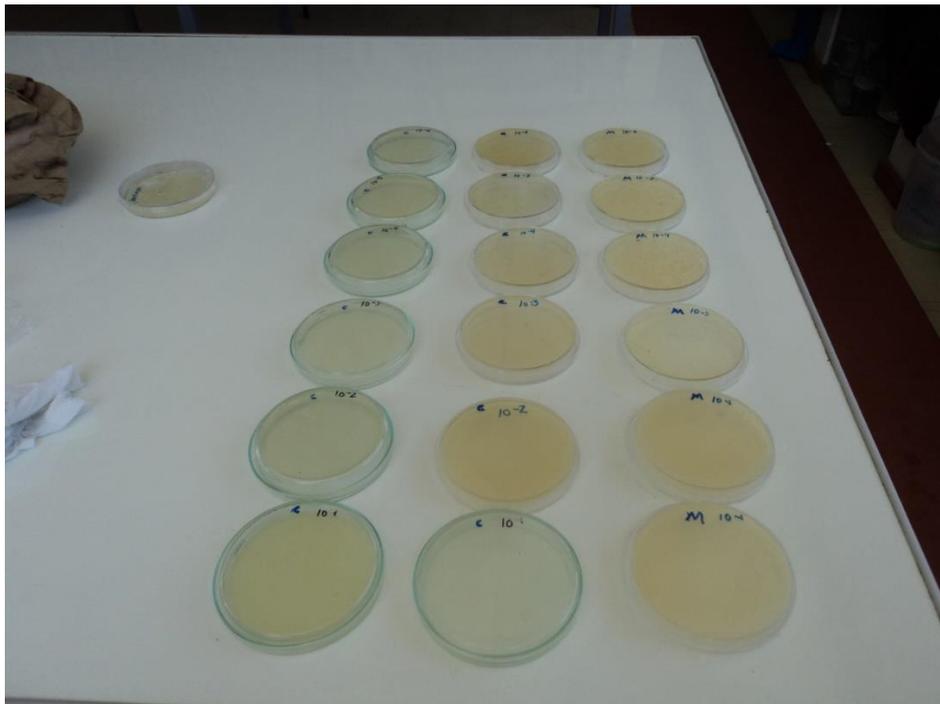
| Cepas aisladas            | Total | Estructura del huevo     |       |          |       |        |       |
|---------------------------|-------|--------------------------|-------|----------|-------|--------|-------|
|                           |       | Membrana corioalantoídea |       | Albumina |       | Vitelo |       |
|                           | N°    | N°                       | %     | N°       | %     | N°     | %     |
| <i>Escherichia coli</i>   | 33    | 11                       | 33.33 | 11       | 33.33 | 11     | 33.33 |
| <i>Staphylococcus sp.</i> | 23    | 9                        | 39.13 | 6        | 26.08 | 8      | 34.78 |
| <i>Alcaligenes sp.</i>    | 18    | 6                        | 33.33 | 6        | 33.33 | 6      | 33.33 |
| <i>Bacillus sp.</i>       | 14    | 5                        | 35.71 | 3        | 21.42 | 6      | 42.85 |
| <i>Streptococcus sp.</i>  | 15    | 4                        | 26.66 | 5        | 33.33 | 6      | 40.00 |
| <i>Micrococcus sp.</i>    | 9     | 3                        | 33.33 | 3        | 33.33 | 3      | 33.33 |
| <i>Corynebacterium sp</i> | 4     | 2                        | 50.00 | 1        | 25.00 | 1      | 25.00 |
| <i>Pseudomonas sp.</i>    | 4     | 2                        | 50.00 | 1        | 25.00 | 1      | 25.00 |

**Fuente:** (Cubillos et al., 1981)

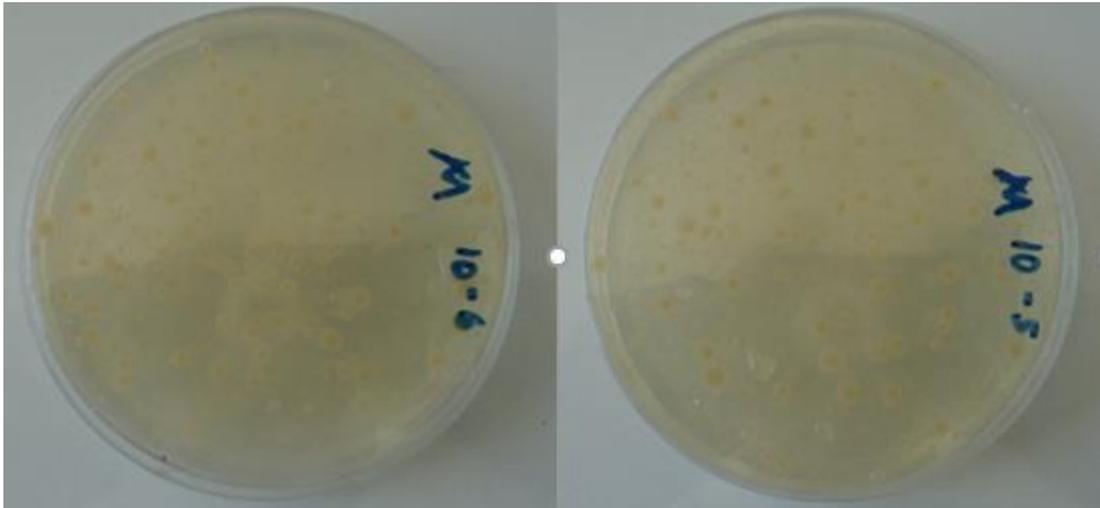
**Tabla 18.** Distribución de cepas aisladas en diferentes estructuras de huevos no eclosionados.

| Cepas aisladas            | Total | Estructura del huevo     |        |        |       |         |        |
|---------------------------|-------|--------------------------|--------|--------|-------|---------|--------|
|                           |       | Membrana corioalantoídea |        | Vitelo |       | Embrión |        |
|                           | N°    | N°                       | %      | N°     | %     | N°      | %      |
| <i>Escherichia coli</i>   | 15    | 5                        | 33.33  | 4      | 26.55 | 6       | 40.00  |
| <i>Staphylococcus sp.</i> | 7     | 2                        | 28.57  | 2      | 28.57 | 3       | 43.85  |
| <i>Alcaligenes sp.</i>    | 6     | 2                        | 33.33  | 2      | 33.33 | 2       | 33.33  |
| <i>Pseudomonas sp.</i>    | 5     | 1                        | 20.00  | 2      | 40.00 | 2       | 40.00  |
| <i>Shigella sp.</i>       | 5     | 2                        | 40.00  | 1      | 20.00 | 2       | 40.00  |
| <i>Arizona sp.</i>        | 1     | 1                        | 100.00 | -      | -     | -       | -      |
| <i>Bacillus sp.</i>       | 1     | -                        | -      | -      | -     | 1       | 100.00 |
| <i>Citrobacter sp.</i>    | 1     | 1                        | 100.00 | -      | -     | -       | -      |

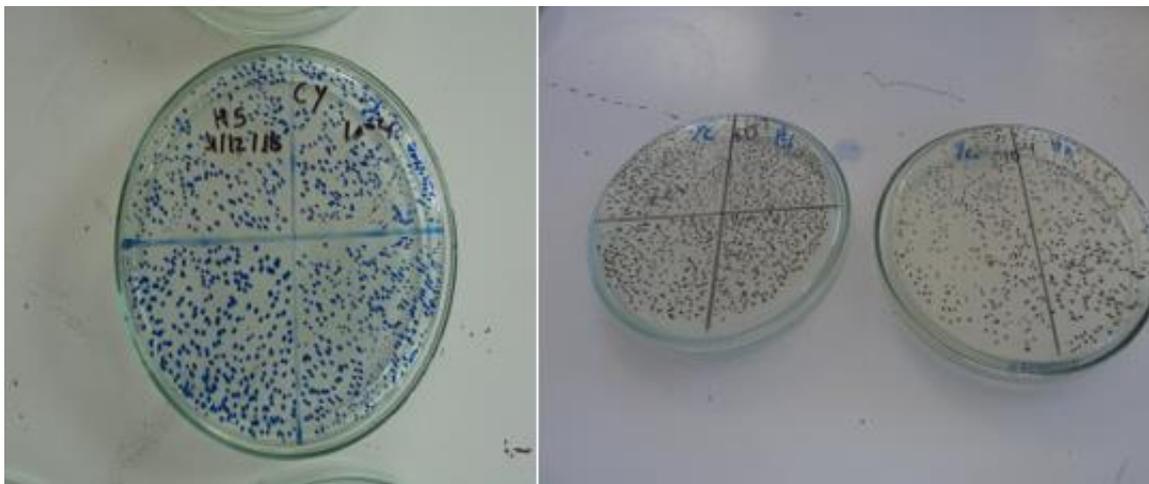
**Fuente:** (Cubillos et al., 1981)



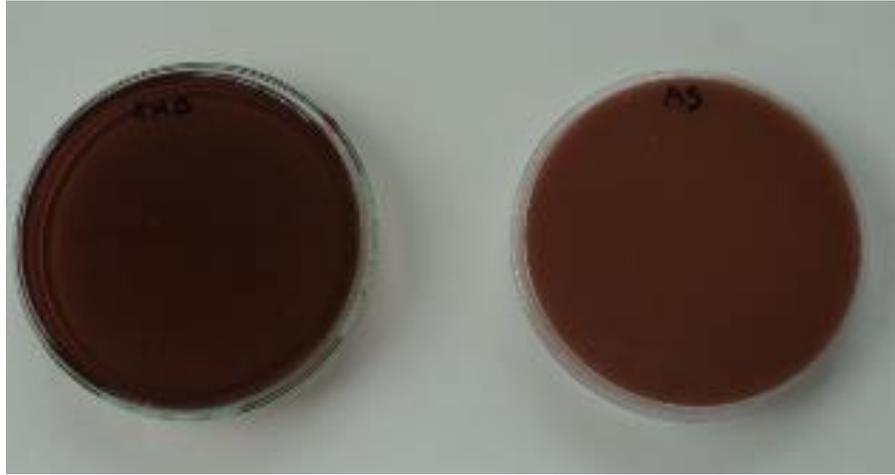
**Figura 19.** Inoculación de las diluciones seriadas con tres repeticiones por cada parte del huevo (membrana interna, clara, yema, membrana corioalantoídea y embrión). Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



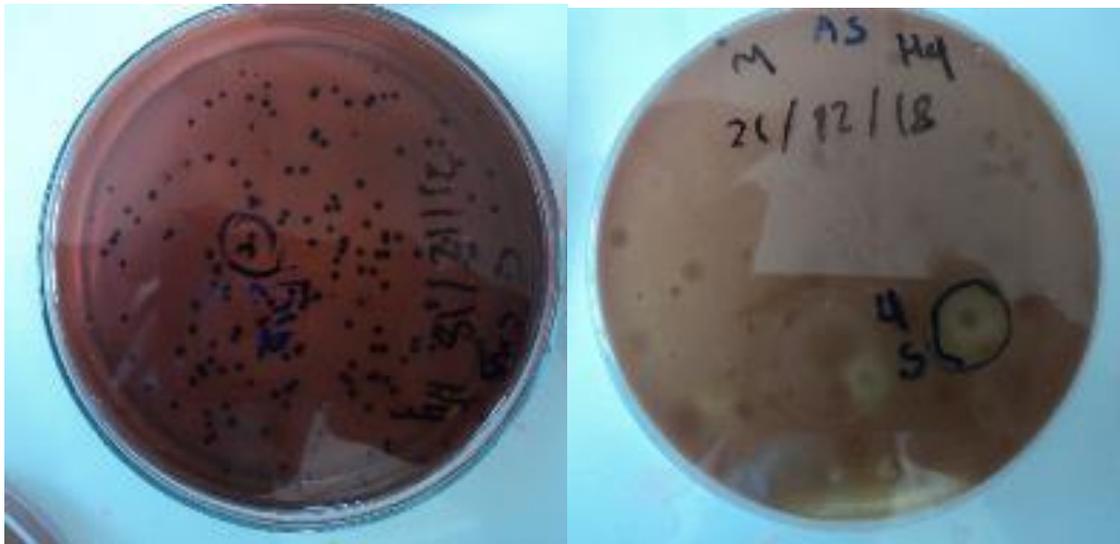
**Figura 20.** Selección de placas que contengan entre 30 y 300 colonias. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



**Figura 21.** Placas que mostraron más de 300 colonias se las dividió en secciones radiales convenientes (2,4,8) y se contó todas las colonias en una o más secciones. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



**Figura 22.** Medios de cultivo Agar EMB y Agar Sangre. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



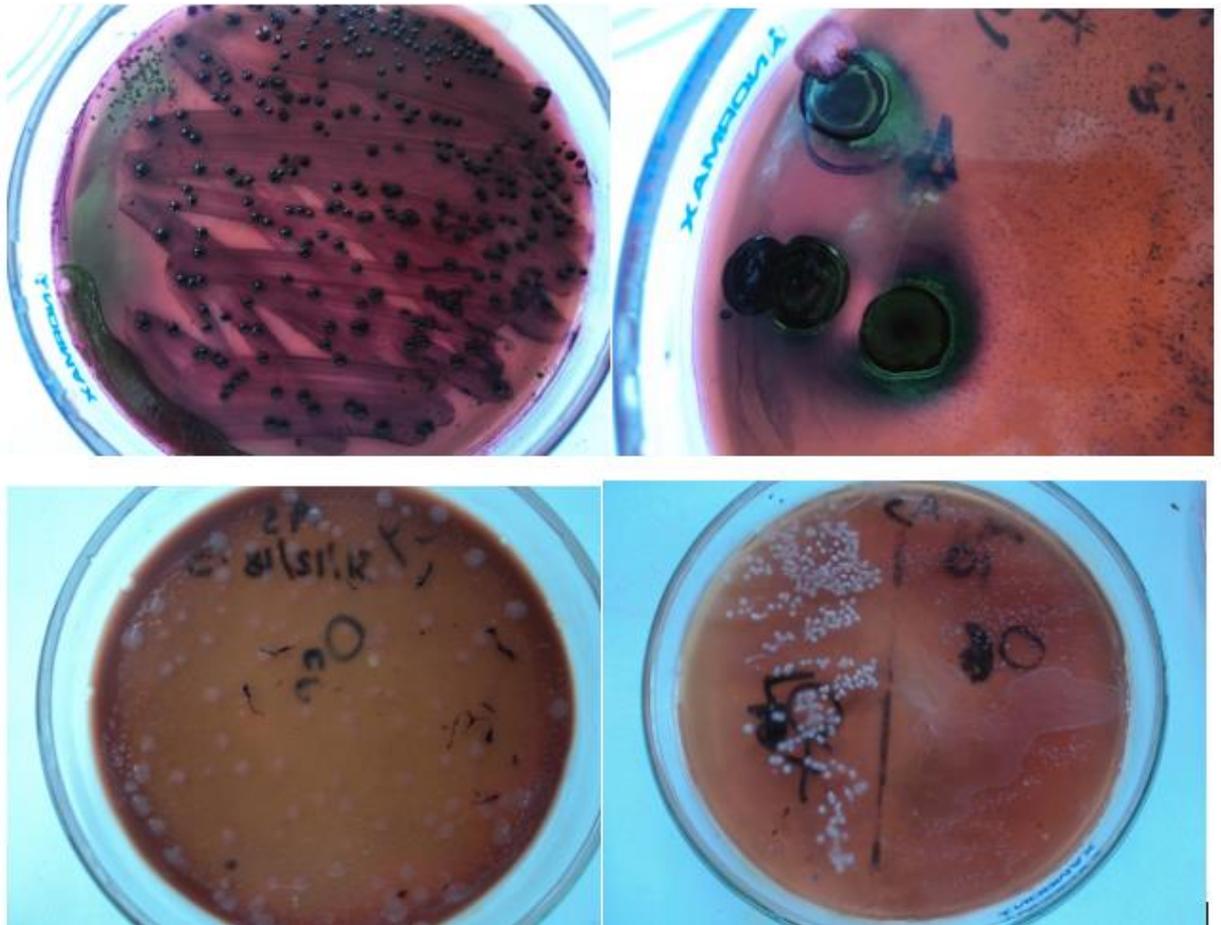
(a)

(b)

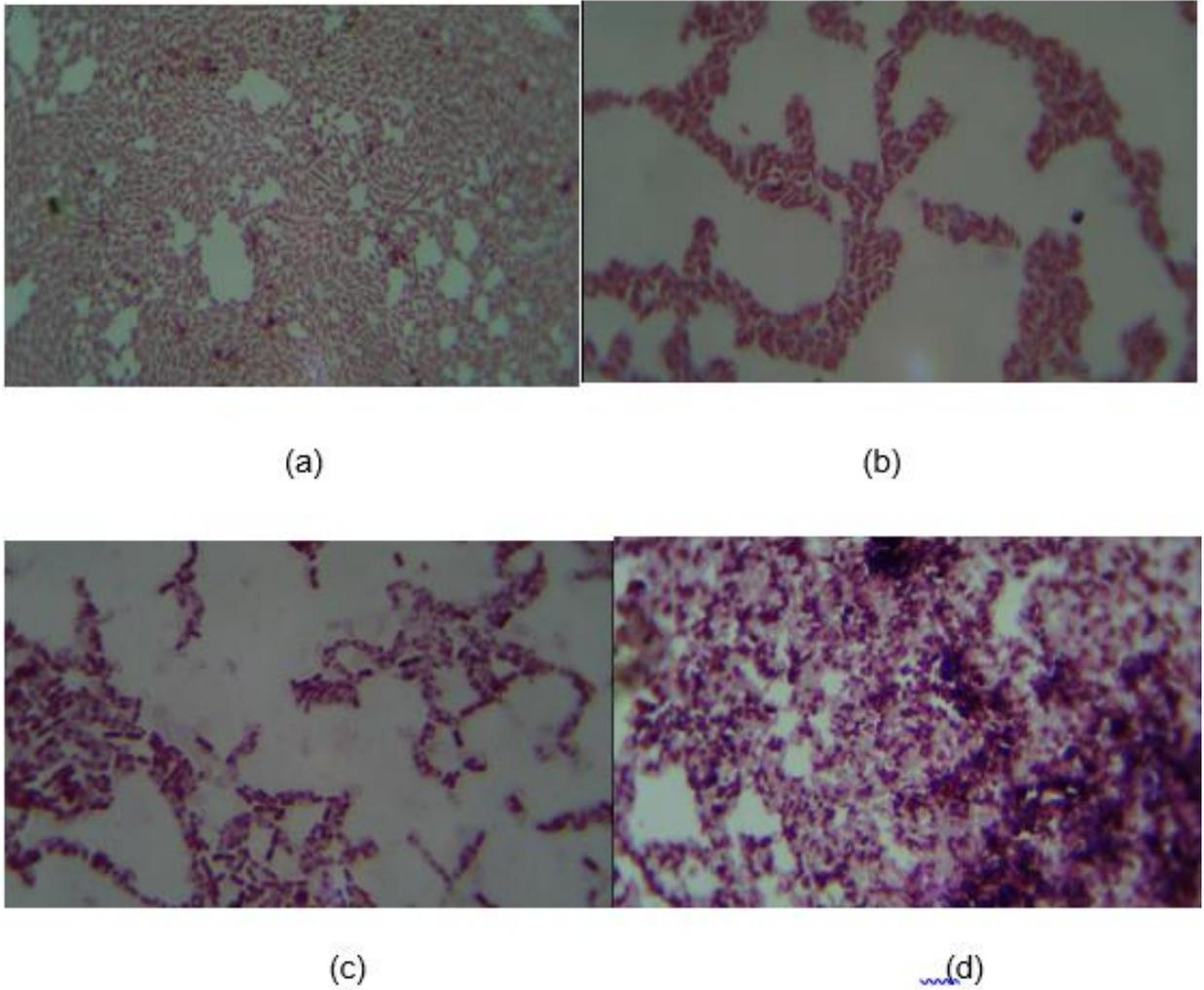
**Figura 23.** Crecimiento positivo (a) Agar EMB (b) Agar Sangre. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano (enero, 2019).



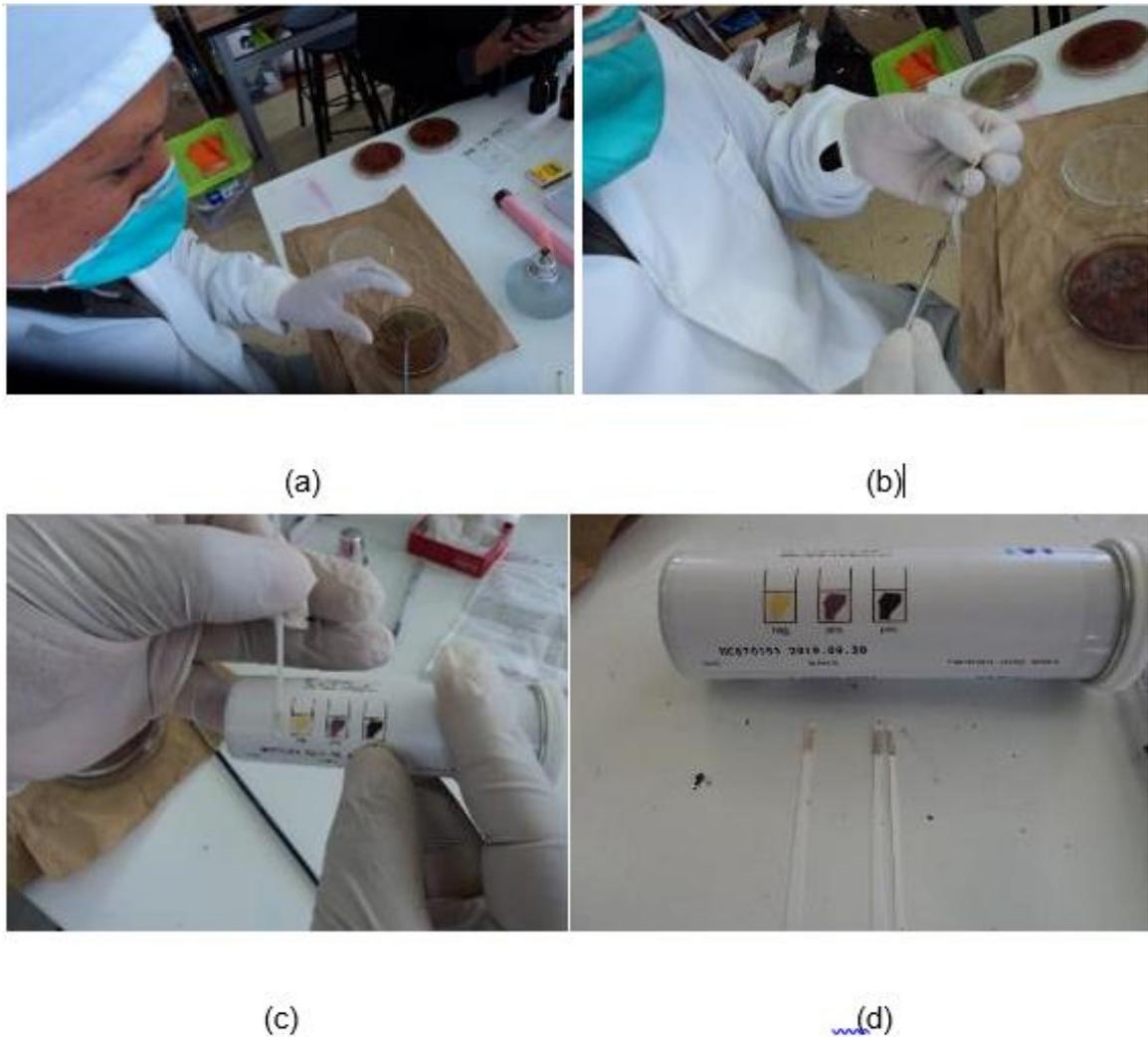
**Figura 24.** Método de tinción Gram, realizado para cada uno de los cultivos. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



**Figura 25.** Aislamiento de microorganismos: parte superior crecimiento en agar EMB y en la parte inferior crecimiento en agar sangre. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano (enero, 2019).



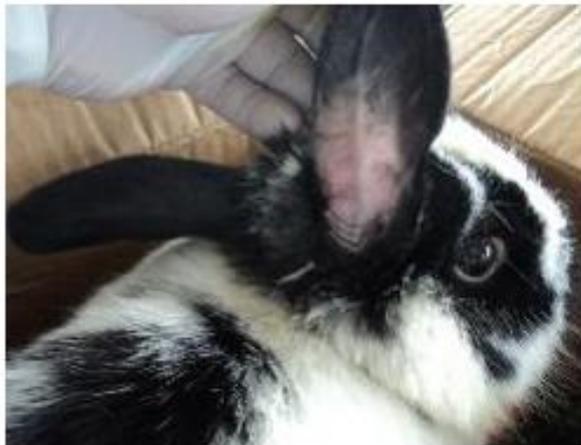
**Figura 26.** Imágenes capturadas a 100x (a) bacilos Gram (-) probable *Pseudomonas sp.* (b) bacilos Gram (-) probable *Escherichia coli.* (c) bacilos Gram (+) probable *Bacillus sp.* (d) cocos Gram (+) probable *Staphylococcus aureus.* Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



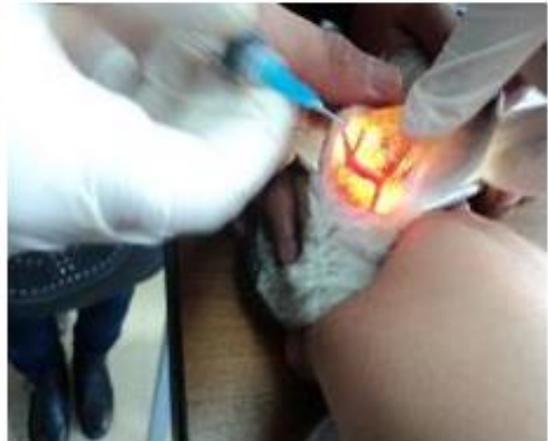
**Figura 27.** Prueba de la oxidasa (a) selección de colonia (b) aplicación de la masa de la colonia en la tira reactiva (c) prueba para *Staphylococcus aureus* con resultado negativo (d) prueba positiva para *Pseudomonas sp.* Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



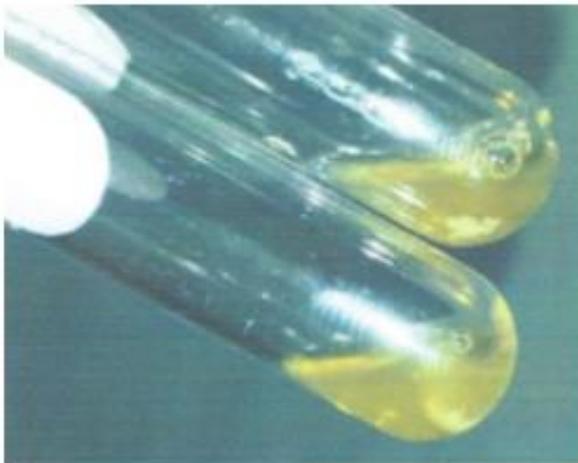
**Figura 28.** Prueba de la catalasa (a) Bacillus (b) Estafilococcus. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



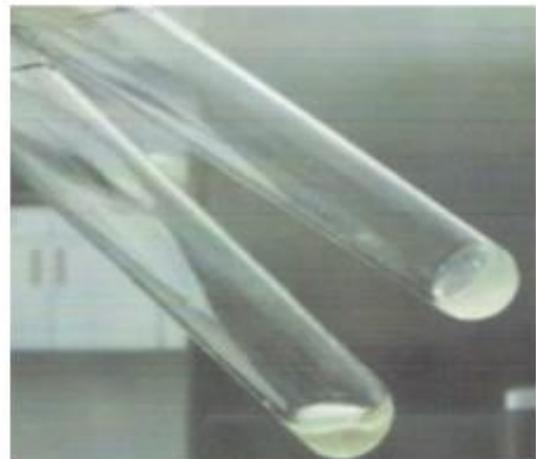
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 29.** Prueba de la coagulasa (a) Zona rasurada de la vena marginal (b) extracción de sangre (c) plasma de conejo (d) prueba coagulasa-positiva para *Staphylococcus aureus*. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero,2019).



(a)



(b)

**Figura 30.** Prueba de TSI (a) medio sin inocular (b) prueba positiva cambio de color A/A Gas ++. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).

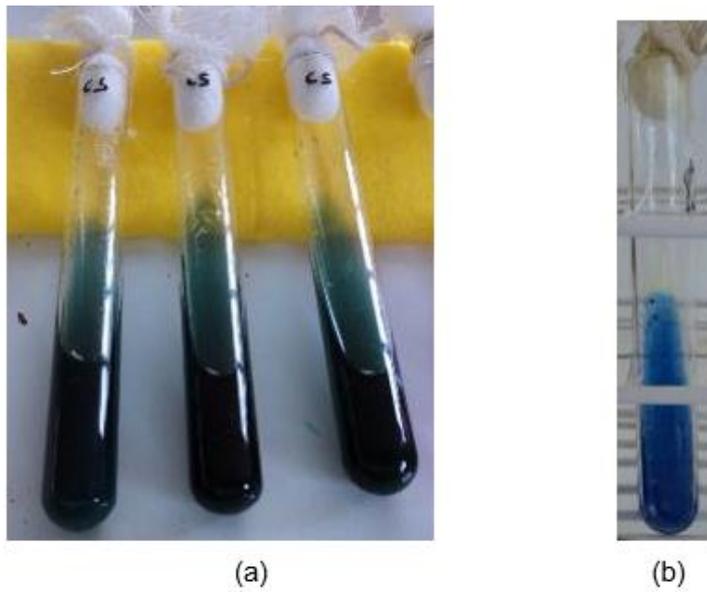


(a)



(b)

**Figura 31.** Prueba de LIA (a) medio sin inocular (b) prueba negativa no cambia de color K/K. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



**Figura 32.** Prueba Citrato de Simons (a) medio sin inocular (b) prueba positiva, cambio de color. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



**Figura 33.** Prueba indol (a) adición del reactivo de kovacs (b) reacción positiva del anillo rojo que indica producción de indol. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).



(a)



(b)

**Figura 34.** Prueba de SIM (a) adición de reactivo de Kovacs (b) reacción positiva a sulfuro de hidrogeno, positivo indol, positivo Movilidad. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019)



(a)



(b)

**Figura 35.** Prueba de Urea (a) medio sin inocular (b) reacción positiva cambio de color. Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Universidad Nacional del Altiplano. (enero, 2019).

## RECOLECCION DE MUESTRAS IN SITU:



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 36.** Lugar de recolección de muestras: (a) centro poblado de Tupala (b) Módulo de rescate del suri Chapuco (c) Muestras de huevos de suri (d) Entrega de muestras de huevo de suri por parte del encargado del módulo Chapuco. (Enero, 2019).

## MATERIALES DE LABORATORIO:



(a)



(b)

**Figura 37.** Materiales (a) Materiales esterilizados (b) placas dispuestas para plaqueo.

## PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)



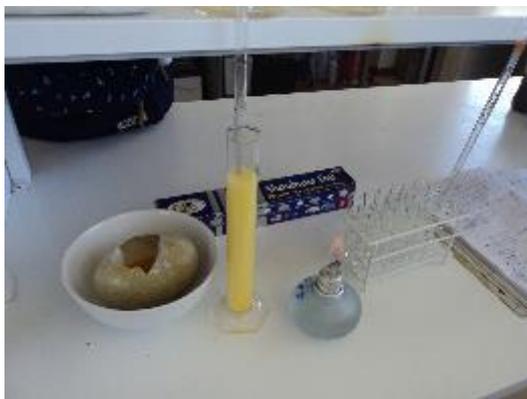
(h)



(i)



(j)



(k)

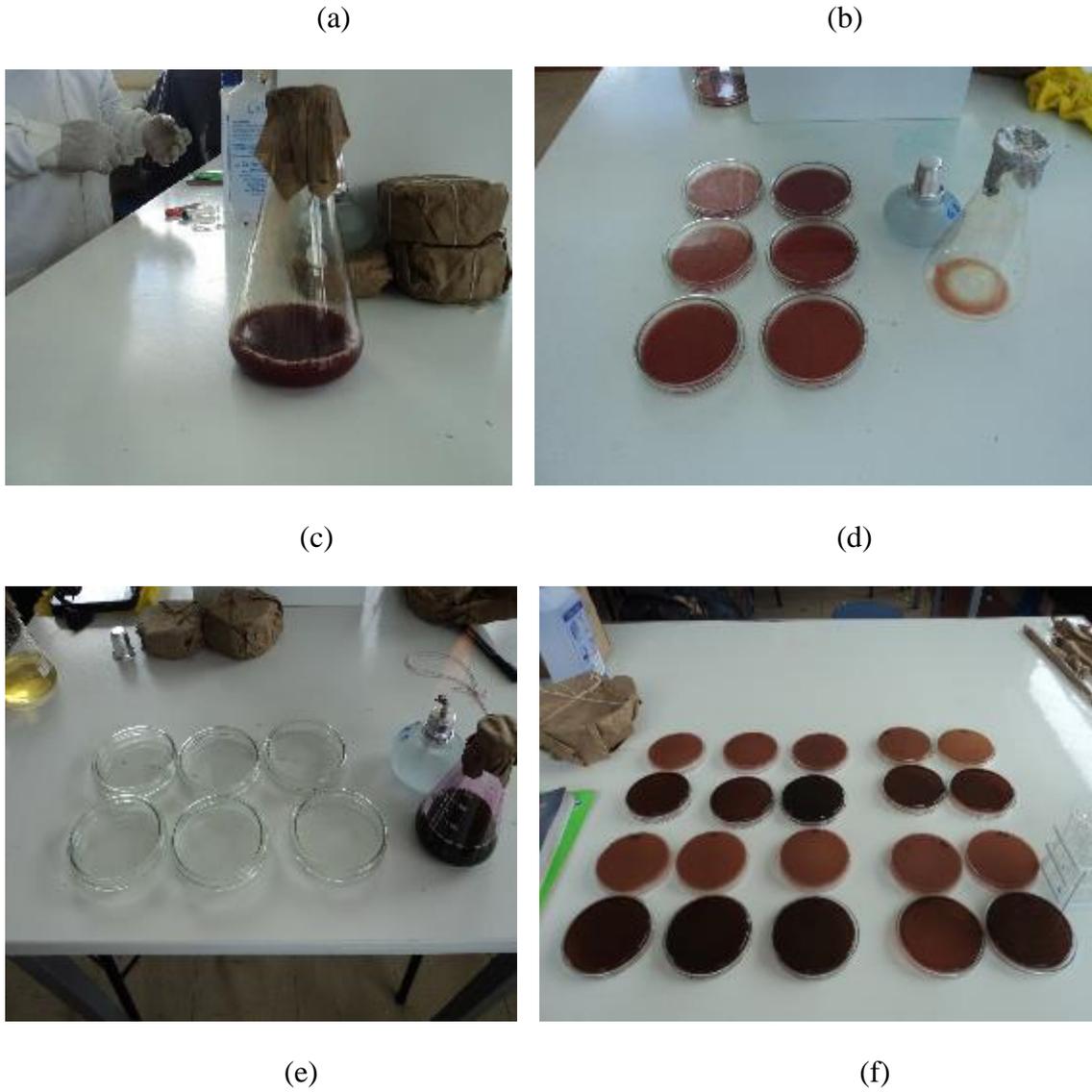


(l)

**Figura 38.** Pasos del procesamiento de muestra (a) Muestra (b) Desinfección con povidona yodada (c) Piquete del huevo con estilete (d) Ruptura de la cascara con la ayuda de unas pinzas (e) Apertura completa del huevo (f) Vaciado de la albumina en un envase estéril (g) albumina (h) yema (i) vertido de 10 ml de yema (j) vertido 10ml de albumina (K) dilución de muestra  $10^{-1}$  (l) Tubos dispuestos para realizar diluciones seriadas.

## PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO:





**Figura 39.** Preparaciones Agar sangre y Agar EMB (a) y (b) extracción de sangre de conejo (c) preparado de agar sangre (d) vertido en placas con agar sangre (e) medio EMB (f) placas con agar EMB y agar sangre.

## PREPARACION DE PRUEBAS DIFERENCIALES



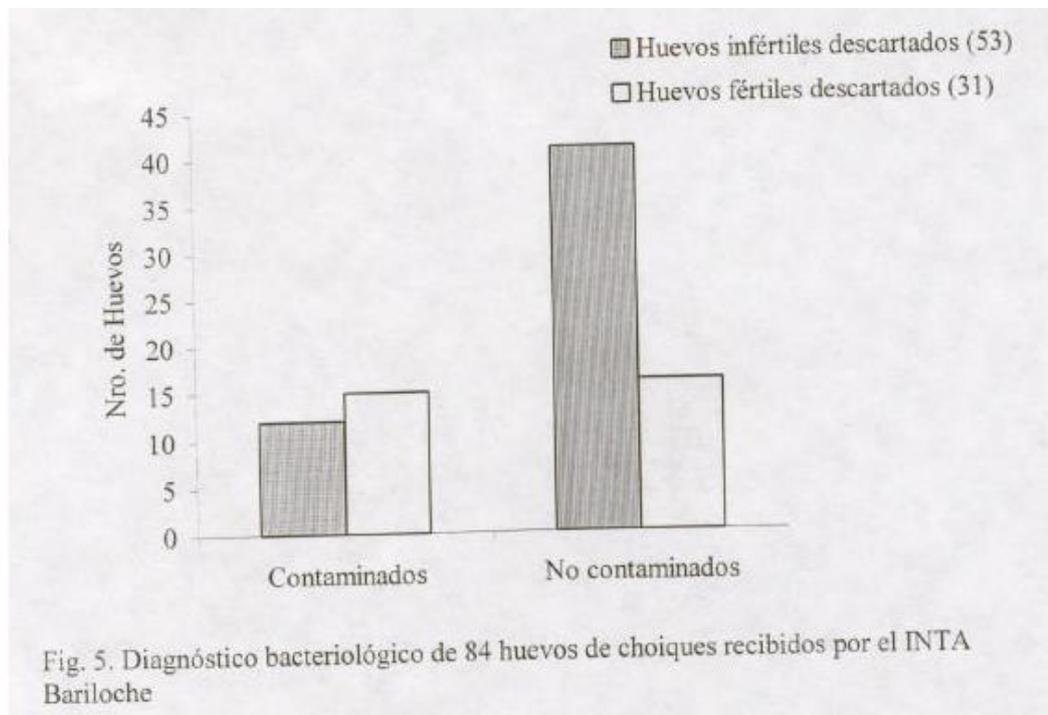
**Figura 40.** Medios de cultivo que fueron pesados de diferentes medios de cultivo diferenciales de la marca HIMEDIA.



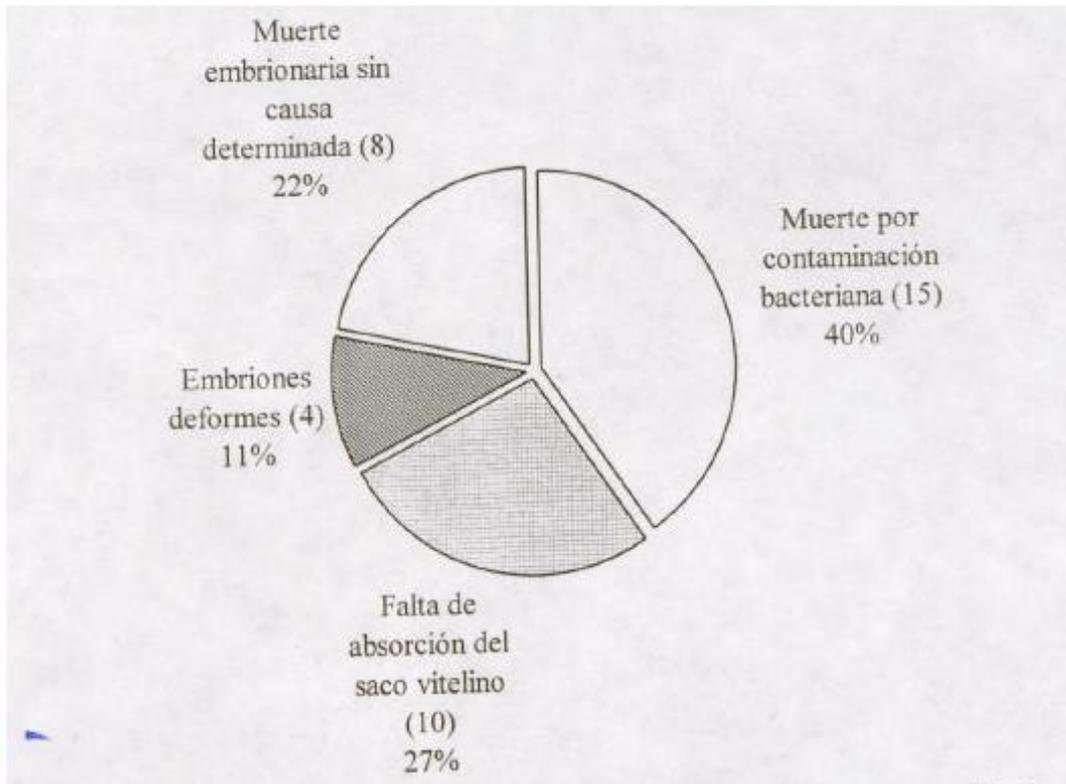
**Figura 41.** Medios de cultivo preparados, nótese la diferencia de colores de derecha a izquierda que pertenecen al medio TSI, LIA, Citrato de Simmons, Agua trioptona, Manitol salado, SIM, Agar urea.



**Figura 42.** Tubos con medios en pico de flauta.



**Figura 43.** Diagnóstico bacteriológico de 84 huevos de choiques recibidos por el INTA Bariloche 2001.



**Figura 44.** Mortalidad embrionaria en 37 huevos (42%) recibidos por el INTA Bariloche 2001.



*Universidad Nacional del Altiplano de Puno*

Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Profesional de Biología  
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico  
Laboratorio de Microbiología de los Alimentos



## CONSTANCIA

LA QUE SUSCRIBE, JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que el Bachiller **CARLOS ALBERTO PÉREZ ACUÑA**, egresado de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado: “**ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO EN HUEVOS DESECHADOS DE INCUBACIÓN NATURAL EN SEMICAUTIVERIO DE *Rhea pennata* EN EL CENTRO DE RESCATE DEL PELT, 2018**”, en el laboratorio de Microbiología de los Alimentos, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de febrero a mayo del 2019.

Se le expide la presente Constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 03 de junio del 2019.



**Bol. M. Sc. EVA LAURA CHAUCA DE MEZA**  
Jefe de Laboratorio de Microbiología de los Alimentos  
FCCBB – UNA Puno