

Efecto de tres programas nutricionales en la calidad microbiológica del huevo

Andrea Belén Chica Loayza

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Octubre, 2014

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de tres programas nutricionales en la calidad microbiológica del huevo

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Andrea Belén Chica Loayza

Zamorano, Honduras
Octubre, 2014

Efecto de tres programas nutricionales en la calidad microbiológica del huevo

Presentado por:

Andrea Belén Chica Loayza

Aprobado:

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Abel Gernat, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto de tres programas nutricionales en la calidad microbiológica del huevo

Andrea Belén Chica Loayza

Resumen: Durante años, en Honduras la calidad de huevo ha sido determinada por parámetros físicos pero no se ha conocido la calidad microbiológica desde su puesta hasta su almacenamiento. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos líneas de gallinas ponedoras (Hy-line CV-22[®] y Dekalb White[®]) y tres programas nutricionales (1, 2, 3) en la calidad microbiológica interna y externa del huevo fresco y determinar el efecto de las líneas y programas nutricionales en la vida anaquel del huevo. Se realizaron los análisis microbiológicos en el día 0 y durante cuatro semanas, almacenando los huevos a 25 ± 3 °C con una HR de 40-50%. El diseño experimental fue BCA con arreglo factorial de 3×2 . Dentro de los resultados no hubo efecto de la línea y el programa nutricional en la carga de mesófilos aerobios externos e internos. Existe efecto del programa nutricional en la carga de externa de coliformes totales, la deficiencia en la calidad del programa nutricional trastorna el desarrollo de la gallina afectando la calidad externa del huevo. No hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos en la vida anaquel, por ende la vida anaquel microbiológica promedio del huevo producido en jaulas convencionales puede ser de 24 días a 25 °C y humedad relativa de 40-50%, la cual fue determinada cuando la carga de mesófilos internos sobrepasa el límite 1 Log UFC g⁻¹ y cumpliendo con las regulaciones microbiológicas de ausencia de *Salmonella* spp. en 25 mL.

Palabras clave: Almacenamiento, límite microbiológico, vida anaquel del huevo.

Abstract: For years in Honduras has been determined by physical egg quality parameters, but has not been known microbiological quality since its start up to storage. The aim of this study was to evaluate the effect of two lines of laying hens (Hy-line CV-22[®] and Dekalb White[®]) and three nutritional programs (1, 2, 3) in the internal and external microbiological quality of fresh egg, and to determine the effect of the lines and feedings on the egg shelf life. Microbiological analyses were realized on day 0 and during four weeks, eggs were stored at 25 ± 3 °C with 40-50% RH. The experimental design was BCA with factorial 3×2 . In the results, there was no effect of line and concentrate on the load of external and internal aerobic mesophilic. The diet has an effect on the external load of total coliforms; the deficiency in the quality of the concentrate disrupts the development of the hen affecting the external egg quality. There were no significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments on shelf life, therefore the microbiological average of the shelf life of egg produced in conventional cages may be 24 days at 25 °C and relative humidity of 40-50%, which was determined when the load exceeds the internal mesophilic limit 1 log CFU g⁻¹ and complied with the microbiological regulations of absence of *Salmonella* spp. in 25 mL.

Keywords: Microbiological limit, shelf life of egg, storage.

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Página de firmas.....	ii
	Resumen.....	iii
	Contenido.....	iv
	Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1	INTRODUCCIÓN	1
2	MATERIALES Y MÉTODOS	3
3	RESULTADOS Y DISCUSIONES	10
4	CONCLUSIONES.....	15
5	RECOMENDACIONES.....	16
6	LITERATURA CITADA	17
7	ANEXOS	20

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros		Página
1.	Tratamientos de programas nutricionales y líneas de gallinas ponedoras	3
2.	Perfil nutricional en porcentaje de la dieta 1 (18-42 semanas de edad).....	3
3.	Perfil nutricional en porcentaje de la dieta 1 (43-65 semanas de edad).....	4
4.	Perfil nutricional en porcentaje de la dieta 2 (18-42 semanas de edad).....	4
5.	Perfil nutricional en porcentaje de la dieta 2 (43-65 semanas de edad).....	4
6.	Perfil nutricional en porcentaje de la dieta 3 para línea Hy-line CV-22 [®] en las fases de producción (18-65 semanas de edad).....	5
7.	Perfil nutricional en porcentaje de la dieta 3 para línea Dekalb White [®] en fases de producción (18-65 semanas de edad).....	5
8.	Análisis estadístico de mesófilos aerobios externos e internos y coliformes totales externo del huevo fresco (día 0)	10
9.	Recuento promedio de mesófilos aerobios en el cascarón de huevo por fases.....	11
10.	Recuento promedio de coliformes totales en el cascarón del huevo fresco por programa nutricional.....	11
11.	Recuento de coliformes totales del cascarón de huevo fresco por fases de los tratamientos	12
12.	Recuento de mesófilos aerobios internos por fases de los tratamientos.	13
13.	Análisis estadístico de vida anaquel.....	14
14.	Vida anaquel promedio de los tratamientos	14
Anexos		
1.	Recuento de mesófilos aerobios del cascarón de huevo fresco por fases de los tratamientos.	20
2.	Recuento de mesófilos aerobios internos de huevo fresco por fases de los tratamientos.	20
3.	pH del huevo fresco de los tratamientos por fase.	20
4.	Recuento de mesófilos aerobios internos del huevo de los tratamientos durante vida anaquel.	21
5.	Recuento de mesófilos aerobios externos del huevo durante vida anaquel. .	21
6.	Recuento de coliformes totales externos del huevo durante vida anaquel....	21

1. INTRODUCCIÓN

El huevo es uno de los alimentos más reconocidos y demandados en la dieta alimenticia, debido a su alto valor nutricional (Hernández y Sastre 1999). Según el reporte del diario Tiempo (2013), el consumo por habitante hondureño es de 120 huevos al año.

Un huevo de buena calidad debe poseer una cáscara limpia e intacta, con unidades Haugh mayores a 60, y que no posea materia u olores extraños (Ruiz 2010). El pH del huevo fresco es 7.6 y 7.9 (Pascual y Calderón 2000).

Dentro de la industria hondureña, el almacenamiento de los huevos en su mayoría es a la intemperie, esto vuelve más susceptible a daños en la calidad física y microbiológica del huevo (Colavitti y Ernest 2011). Las posibles fuentes de contaminación de un huevo pueden ser en la manipulación, ambiente, parte interna del animal, lavado del huevo y heces (INPROVO 2003).

Los factores que influyen en la carga microbiana del huevo pueden ser el pH, la carga inicial en la cáscara, la temperatura y humedad relativa de almacenamiento. Una alta humedad relativa promueve el crecimiento de moho, no debe exceder al 80% (Ruiz 2010).

Tras un almacenamiento, varias características del huevo van afectarse como el albumen, la yema y crecimiento microbiano. El albumen pierde viscosidad debido a la pérdida de agua, CO₂ y cambio del pH, provocando que la proteínas se desnaturalicen y se vuelve acuoso (Rosales *et al.* 2010). La yema absorbe humedad del albumen, provocando un estiramiento y debilidad de la membrana vitelina (Puig 2013).

El huevo posee barreras antimicrobianas que le permiten protegerse, dentro de ellas se encuentra la cutícula, cascarón, membrana interna y externa del cascarón y el albumen (De Reu 2006). La cutícula es una proteína que recubre el huevo (Rosales *et al.* 2010). El albumen posee defensas antimicrobianas como la viscosidad asegura que los microorganismos no tengan libre movilidad para llegar a la yema (Board y Tranter 1995). Existen proteínas antimicrobianas como la lisozima, ovoalbúmina, conalbúmina y ovomucina (Ruiz 2010).

Dentro de los microorganismos indicadores de calidad se encuentran bacterias mesófilas aerobias, coliformes fecales. Las bacterias mesófilas aerobias estiman la flora total, su temperatura optima es 30-45 °C (Perez y Pardo 2006). Los coliformes totales son bacilos, aerobios y anaerobios facultativos, por lo general se encuentran en suelo, agua, cáscaras de huevo (Pascual y Calderón 2000). De Reu (2006) especifica que la carga de bacterias aerobias debe ser entre 3 y 5 Log UFC/g de huevo en condiciones limpias.

Salmonella spp. ha sido uno de los microorganismos responsables de infecciones en España y países del entorno transmitidas en los huevos (Instituto de Estudios del Huevo 2007). Dentro de las más comunes en aves son *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium (Rincón *et al.* 2011). Su presencia en concentrados depende de factores como almacenamiento, limpieza, plagas, materias primas de fuente animal, temperaturas y humedades (Creus 2012).

Una de las claves del éxito en la postura de la gallina ponedora es un tratamiento nutricional, el cual cumpla con los requerimientos nutricionales. La curva de producción de la gallina ponedora consta desde la semana 18 hasta la 65, se divide en 4 fases y dentro de cada fase se suministra alimento que cumpla con los requerimientos nutricionales. En cada fase la producción de huevo por día cambia, aumentado hasta el 93% en la semana 32 y desciende hasta el 78% en la semana 65 (Hy-Line International 2011).

Dentro de los programas nutricionales que se brindan a la gallina en fases: la fase uno, la dieta posee el nivel más alto de proteína, fósforo y calcio, además rico en aminoácidos. A partir de la semana 45, los niveles de calcio se elevan y baja el nivel de fósforo. A medida que avanza la edad de la gallina, los niveles de calcio y vitamina D aumentan para evitar el adelgazamiento de la cáscara del huevo (Mundo Agropecuario 2013).

Actualmente no existen datos contundentes que especifiquen la calidad microbiológica del huevo durante su almacenamiento, vida anaquel microbiológica y diferencias ante tratamientos nutricionales del mercado Centro Americano.

Pujols (2012) estudió el efecto del recubrimiento con aceite de soya, alfa y beta quitosano y sus combinaciones en emulsión en la calidad y vida anaquel del huevo, donde los tratamientos con aceite de soya y las emulsiones fueron los mejores para mantener la frescura de los huevos después de cinco semanas a 25 °C.

Pasquali, *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la adición de CO₂ y O₂ como atmósfera modificada y temperaturas de 4 °C, 25 °C y 37 °C, en bacterias patógenas y descomposición. Los empaques con 100% CO₂ a 4 °C mostraron un efecto positivo en la reducción de *Salmonella*.

Huneau, *et al.* (2010) evaluaron los factores que influyen en la contaminación bacteriana del cascarón del huevo en jaulas convencionales, jaulas amobladas y al aire libre para gallinas ponedoras bajo condiciones comerciales. Se mostró que la carga de mesófilos aerobios es mayor en corrales (4.82 ± 0.51 log UFC/g) que en jaulas (4.57 ± 0.58 log UFC/g) (P= 0.09).

Los objetivos fueron:

- Determinar efecto del programa nutricional y línea ponedora en la carga microbiana de huevo fresco.
- Determinar la presencia de *Salmonella* spp. en el huevo.
- Evaluar efecto del programa nutricional y línea ponedora en la vida de anaquel del huevo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y detalle del estudio. Los huevos de este estudio fueron recolectados de una producción de 47 semanas (julio de 2013 hasta junio de 2014) desarrollada en Centro de Investigación Avícola de Zamorano, con una temperatura promedio anual de 24 °C, una precipitación anual de 1100 mm. Se recolectaron un total de 1,344 huevos, de los cuales 960 huevos frescos fueron usados para el estudio microbiológico de la parte interna y externa y 384 huevos para la prueba de *Salmonella* spp. Las gallinas ponedoras se manejaron en un galpón de postura con 224 jaulas, distribuidas siete aves al azar por jaula, cuatro jaulas conformaban un tratamiento, los seis tratamientos estaban ordenados al azar, formando una sección. Hubo un total ocho secciones con agua y alimento.

Tratamientos. Se evaluaron tres programas nutricionales y dos líneas de gallinas ponedoras (Cuadro 1). Los programas nutricionales fueron: programa nutricional 1 (cuadro 2 y 3), programa nutricional 2 (cuadro 3) y programa nutricional 3. Las líneas de gallinas ponedoras fueron Hy-line CV-22® y Dekalb White® las cuales fueron criadas desde su día 1 de nacimiento. La cosecha de huevos fue por fases: Fase 1: Semana 18- 32 (19 julio a 25 de octubre); Fase 2: Semana 33- 44 (8 de noviembre a 23 de enero); Fase 3: Semana 45-58 (31 de enero a 1 de mayo); Fase 4: Semana 59-65 (9 de mayo a 19 de junio).

Cuadro 1. Tratamientos de programas nutricionales y líneas de gallinas ponedoras.

Programas nutricionales	Línea	
	Hy-line CV-22®	Dekalb White®
1	H1	D1
2	H2	D2
3	H3	D3

Cuadro 2. Composición nutricional en porcentaje de la dieta 1 (18-42 semanas de edad).

Composición	Máximo	Mínimo
Humedad	13.50	
Proteína		19.00
Grasa		4.00
Fibra	5.00	
Calcio	4.60	4.00
Fósforo Total	6.60	
Ceniza	14.00	11.00
Sal	0.50	0.25

Cuadro 3. Composición nutricional en porcentaje de la dieta 1 (43-65 semanas de edad).

Composición	Máximo	Mínimo
Humedad	13.50	
Proteína		16.00
Grasa		5.00
Fibra	5.00	
Calcio	4.60	4.00
Fósforo Total	6.60	
Ceniza	14.00	11.00
Sal	0.50	0.25

Cuadro 4. Composición nutricional en porcentaje de la dieta 2 (18-42 semanas de edad).

Composición	Máximo	Mínimo
Humedad	13.00	
Proteína		18.00
Grasa		1.50
Fibra	8.00	
Calcio	4.60	4.00
Fósforo Total	6.60	
Ceniza	14.00	11.00
Sal	0.50	0.25

Cuadro 5 Composición nutricional en porcentaje de la dieta 2 (43-65 semanas de edad).

Composición	Máximo	Mínimo
Humedad	13.00	
Proteína		17.00
Grasa		1.50
Fibra	8.00	
Calcio	4.60	4.00
Fósforo Total	6.60	
Ceniza	14.00	11.00
Sal	0.50	0.25

Cuadro 6. Composición nutricional en porcentaje de la dieta 3 para línea Hy-line CV-22[®] en las fases de producción (18-65 semanas de edad).

Composición:	Fase I 18-28	Fase II 29-50	Fase III 51-65
Proteína cruda	19.80	18.93	18.91
Energía metabolizable (Kcal/kg)	2995.00	2945.00	2945.00
Calcio	4.10	4.10	4.30
P Disponible	0.41	0.36	0.32
DMetionina	0.44	0.41	0.41
DLisina	0.93	0.87	0.88
DMetionina + Cistina	0.70	0.66	0.66
DTreonina	0.63	0.60	0.60
DTriptofano	0.20	0.19	0.19
DArginina	1.19	1.12	1.12
DIsoleucina	0.73	0.70	0.70
DValina	0.78	0.74	0.74
Sodio	0.20	0.20	0.20
Cloro	0.29	0.29	0.29
Ác.Linoleico	1.64	1.61	1.63

Cuadro 7. Composición nutricional en porcentaje de la dieta 3 para línea Dekalb White[®] en fases de producción (18-65 semanas de edad).

Composición	Fase I 18-28	Fase II 29-50	Fase III 51-65
Proteína cruda	19.80	18.93	18.91
Energía metabolizable (Kcal/kg)	2995.00	2945.00	2945.00
Calcio	4.10	4.10	4.30
Fósforo Disponible	0.41	0.36	0.32
DMetionina	0.44	0.41	0.41
DLisina	0.93	0.87	0.88
DMetionina + Cistina	0.70	0.66	0.66
DTreonina	0.63	0.60	0.60
DTriptofano	0.20	0.19	0.19
DArginina	1.19	1.12	1.12
DIsoleucina	0.73	0.70	0.70
DValina	0.78	0.74	0.74
Sodio	0.20	0.20	0.20
Cloro	0.29	0.29	0.29
Ác. Linoléico	1.64	1.61	1.63

Recolección de huevos. En cada fase, se recolectaron todos los huevos de cuatro secciones aleatoriamente, nombrándolas como sección uno, dos, tres y cuatro, y sus

tratamientos respectivos. Se transportaron los huevos al Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ) para analizados como huevo fresco y ser almacenados.

Almacenamiento de huevos. En cada fase de recolección, los huevos fueron almacenados por cuatro semanas a temperatura ambiente 25 ± 3 °C y humedad relativa 40-50%.

Submuestreo. Por semana, de cada sección se tomaron dos huevos de cada tratamiento, uno para análisis externo y otro para interno. Se realizaron dos repeticiones por tratamiento, ya que se unieron el huevo de la sección uno y dos como repetición uno, la sección tres y cuatro como repetición dos, de tal manera que se usaron dos huevos por réplica para cada análisis microbiológico.

Muestra interna de mesófilos aerobios. Se lavaron los huevos con agua a 45 °C (previamente esterilizada) y xedex utilizando un cepillo estéril. Posteriormente, se rociaron con etanol al 70% para sanitizarlos. Utilizando un guante estéril se tomaron dos huevos del submuestreo por tratamiento a analizar y se quebraron en un envase de vidrio esterilizado cayendo dentro del mismo. Se mezcló con una cuchara estéril hasta obtener una mezcla homogénea. Luego, se pesó 11 gramos en una bolsa plástica estéril de 8×12 cm, se agregaron 99 mL de buffer de fosfato y homogenizó en el stomacher (IUL Instruments). Posteriormente, se vació 1 mL de la solución en un plato petri (10^{-1}) y se agregó agar cuenta estándar fundido (ACE) hasta cubrir 2/3. Se agitó suavemente sobre la mesa para mezclar el inóculo con el medio de cultivo. Se esperó a que el agar se solidifique para ser invertidas e incubadas a 35 °C (Thermo Scientific) durante 48 h.

Muestra externa de mesófilos aerobios y coliformes totales. Los huevos con sangre o heces, se limpiaron con agua a 45 °C (previamente esterilizada) y xedex utilizando un cepillo estéril. Utilizando un guante de látex se tomó los huevos preseleccionados de cada tratamiento y se quebraron en el envase de vidrio esterilizado del mismo tratamiento. Se tomaron los cascarones y se colocaron en una bolsa plástica estéril de 8×12 cm. Se pesó y anotó su peso; se multiplicó el peso por 9 y se agregó dicha cantidad en mL de buffer de fosfato esterilizado. Se homogenizó en el agitador orbital (VWR modelo: 5000 STD) durante 5 min. Luego, se tomó 2 mL de la solución, 1mL en dos platos petri; en el primer plato para mesófilos aerobios, se agregó agar cuenta estándar fundido (ACE) hasta cubrir 2/3 y se agitó suavemente sobre la mesa para mezclar el inóculo con el medio de cultivo. En un segundo plato para coliformes totales, se agregó agar bilis rojo violeta fundido (ABRV) y se agitó suavemente sobre la mesa para mezclar el inóculo con el medio de cultivo. Una vez que se solidificó el ABRV, se agregó una capa fina encima del mismo. Una vez solidificados los medios, se invirtieron las cajas e incubaron a 35°C (Thermo Scientific) durante 24 h los medios ABRV y durante 48 h para ACE.

Medición de pH. Se midió el pH del huevo fresco y durante cuatro semanas de todos los tratamientos utilizando el potenciómetro (Thermo Scientific), se lavó con agua destilada el electrodo y se secó para cada muestra antes ser utilizado.

Pre-enriquecimiento de *Salmonella*. (Andrew *et al.* 2011). A las 4 semanas de almacenamiento se seleccionaron aleatoriamente cuatro huevos de cada tratamiento por

sección. Se agruparon todos los huevos correspondientes de las cuatro secciones del mismo tratamiento, dando un total de 48 huevos por tratamiento. Se lavó los huevos con agua a 45 °C (previamente esterilizada) y xedex utilizando un cepillo estéril. Se roció etanol al 70% para sanitizarlos. Por cada tratamiento, se quebraron los huevos utilizando un guante estéril en una bolsa plástica. Se homogenizó la muestra. Se agregaron 25 mL de la muestra en una bolsa estéril y 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal. Se homogenizó la muestra en el stomacher (IUL Instruments) por cinco minutos. Además, se tomaron 25 g de cada programa nutricional y se agregaron en una bolsa estéril 8x12 pulgadas con 225 mL de caldo universal de pre-enriquecimiento (UP). Para el control positivo de *Salmonella*, se inoculó un tubo de caldo 150 × 15 mm con 10 mL de caldo UP. Se cerraron las nueve muestras y se incubaron a 35 ± 2,0 ° C (Thermo Scientific) por 24 ± 2 horas.

Aislamiento de *Salmonella*. De cada tratamiento y programa nutricional se transfirió 1mL a tubos de 150 × 15 mm con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y 0.1 mL en tubos 150 × 15mm con 10 mL del caldo de tetratonato (TT) y se mezcló en el vortex (Scientific Industries). Se incubaron los tubos de RV a 42 ± 0,2 ° C en un baño maría circulante y regulado (Precision Thermo Scientific) y los tubos de TT a 35 ± 2,0 ° C, por 24 ± 2 horas.

Se prepararon tres medios selectivos en platos petri: sulfito bismuto (BS), xilosa lisina desoxicolato (XLD) y Hektoen entérico (HE) por cada tubo de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y por cada tubo de caldo de tetratonato (TT). Posteriormente, utilizando un asa bacteriológica se tomó una gota de cada tubo por cada uno de los tres medios a sembrar, con el propósito de aislar las bacterias. Antes y después de cada siembra, el asa bacteriológica fue esterilizada utilizando un incinerador de bacterias (McCormick modelo: IV). Una vez sembrados todos los platos petri, se invirtieron e incubados a 35 ± 2,0 ° C (Thermo Scientific) por 24 ± 2 horas.

Morfología de una colonia típica de *Salmonella*. Pasadas las 24 horas en los medios selectivos, de cada plato se identificaron una o dos colonias típicas aisladas, en la base del plato se encerraron y enumeraron. Cada medio mostró ciertas características de una posible colonia de *Salmonella*.

- **Sulfito bismuto.** las colonias son color café, gris o negras y suelen presentar un brillo metálico. Al inicio el color es café con el tiempo de incubación cambia a negro, dándole un efecto de halo.
- **Xilosa lisina desoxicolato.** las colonias son de color rosa con o sin centro negro, o colonias con grandes y brillantes centro negros o completamente negras.
- **Hektoen entérico.** son colonias azul-verdes o azules con o sin centro negro, o colonias con grandes y brillantes centro negros o completamente negras.

Una vez identificadas las colonias aisladas de cada plato, utilizando un asa bacteriológica estéril se tocó levemente el centro de la colonia y se inoculó un tubo de 150 × 15 mm con

agar triple azúcar hierro (TSI) inclinado, se rayó la superficie inclinada y se introdujo el asa dentro del agar hasta el fondo del tubo. Sin flamear, se introdujo el asa dos veces dentro del tubo de 150 × 15 mm de agar inclinado de lisina descarboxilasa (LIA) hasta el fondo del tubo y luego fue estriada la superficie. Este procedimiento se realizó por cada colonia identificada y cada tubo fue rotulado con el número de la colonia inoculada. Una vez inoculadas todas las colonias, se incubaron los tubos de LIA completamente sellados debido a que el proceso es estrictamente anaeróbico y TSI a $35 \pm 2,0$ °C (Thermo Scientific) por 24 ± 2 horas.

Una vez pasadas las 24 horas, se leyeron los tubos de LIA y TSI. En LIA, *Salmonella* la base del tubo es ácido de color amarilla y el pico es alcalino de color rojo, sin o con producción de H_2S (oscurecimiento). En TSI, *Salmonella* produce una reacción alcalina (púrpura) en la base del tubo y oscurecimiento debido a la producción de H_2S . Se almacenaron los tubos en refrigeración (Fisher Scientific) a 4 °C.

Identificación de *Salmonella*. Con los tubos presuntos positivos TSI, se introdujo un asa bacteriológica estéril en el tubo y se transfirió el inóculo en tubos de 150 × 15 mm de cinco mL de caldo urea. Se esterilizó el asa bacteriológica por cada tubo. Una vez inoculados todos los presuntos positivos en caldo urea se incubaron a $35 \pm 2,0$ °C (Thermo Scientific) por 24 ± 2 horas. Los tubos de caldo urea que no mostraron cambio de color eran presuntos positivos de *Salmonella*.

Crecimiento de presuntos positivos de *Salmonella*. De los presuntos positivos y control positivo utilizando un asa bacteriológica estéril, se tomó un inóculo de los tubos de TSI (a temperatura ambiente) y se sembró en platos de agar cuenta estándar. Se esterilizó el asa bacteriológica por cada tubo. Se incubaron los platos invertidos a $35 \pm 2,0$ °C (Thermo Scientific) por 24 ± 2 horas.

Aglutinación. Con un asa bacteriológica estéril se colocó una gota de agua peptonada estéril sobre un placa porta objeto. Se tomó el inóculo del crecimiento y se mezcló con el agua peptonada. Se agregó una gota de antisuero polivalente O para *Salmonella* (Beckton Dickinson) y se mezcló con un asa bacteriológica estéril, si se observaba grumos la muestra era positiva. La placa se lavó con agua destilada y se agregó en agua con cloro. Se realizó este procedimiento para cada presunto positivo de *Salmonella* y control positivo.

Calidad física del huevo. Fue determinada utilizando la prueba Múltiple Egg Test con el equipo QCM. Para realizar este análisis se utilizaron entre 5 y 10 huevos por tratamiento. Estas pruebas se realizaron de huevos frescos y con 4 semanas de almacenamiento.

Unidades Haugh. Se calcularon como la relación entre la altura de albúmina y el peso total del huevo por medio la prueba Egg test.

Diseño experimental. Fueron Bloques completos al azar y arreglo factorial de 3×2 , realizando réplicas por tratamiento, con un total de 48 unidades experimentales. Los factores de estudio fueron tres programas nutricionales (1, 2, 3) y dos líneas de gallinas ponedoras (Hy-Line CV-22® y Dekalb White®) en 4 fases productivas representados

como los bloques durante el estudio. El estudio se llevó a cabo para huevo fresco y vida anaquel en las semanas 0, 1, 2, 3 y 4 semanas (240 mediciones).

Análisis Estadístico. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4®). Para evaluar la interacción de las variables se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) con una separación de medias Duncan, con un nivel de significancia de 0.05; y una correlación entre cargas externas e internas de mesófilos aerobios entre semanas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Cuadro 8. Análisis estadístico de mesófilos aerobios externos e internos y coliformes totales externo del huevo fresco (día 0).

	Modelos	Probabilidad
Mesófilos aerobios externos	Repetición	0.1416
	Fase	<0.0001*
	Línea	0.7486
	Programa nutricional	0.3803
	Línea × Programa nutricional	0.9931
	Línea × Programa nutricional × Fase	0.1172
Coliformes totales externos	Repetición	0.0750
	Fase	0.0589
	Línea	0.9138
	Programa nutricional	0.0094*
	Línea × Programa nutricional	0.9948
	Línea × Programa nutricional × Fase	0.0811
Mesófilos aerobios internos	Repetición	0.0754
	Fase	0.3315
	Línea	0.5382
	Programa nutricional	0.0998
	Línea × Programa nutricional	0.9267
	Línea × Programa nutricional × Fase	0.4789

* Diferencias significativas $P < 0.05$; $N = 48$.

Mesófilos externos del huevo. No se encontró diferencias significativas en la carga microbiana entre las líneas y programas nutricionales ($P > 0.05$) (Cuadro 8). Las fases influyó en la carga bacteriana ($P < 0.0001$). La carga de mesófilos aerobios estuvo entre 3.45 Log UFC g^{-1} y 1.50 Log UFC g^{-1} de cascarón (cuadro 9), aproximándose a la carga inicial de mesófilos aerobios que fue reportada por Pasquali *et al.* (2012) de 3.6 Log UFC g^{-1} en el cascarón huevo. La diferencia entre fases se dió debido a las diferentes épocas del año (junio 2013 a julio 2014) en la cual se recolectaron los huevos, pudiendo influir las condiciones ambientales o manipulación, es por esto que es muy importante las condiciones en las que se encuentre el huevo al momento de la puesta. Sin embargo, cumple con los rangos de bacterias aerobias para condiciones limpias de son 3 y 5 Log UFC g^{-1} (De Reu 2006).

Cuadro 9. Recuento promedio de mesófilos aerobios en el cascarón de huevo por fases.

Fases	Media $\pm$ D.E. (Log UFC g ⁻¹)
1	2.9908 $\pm$ 0.631 ^b
2	3.4508 $\pm$ 0.515 ^a
3	1.5033 $\pm$ 0.668 ^d
4	2.4708 $\pm$ 0.451 ^c
CV (%)	19.99

^{abc} Diferencias significativas entre fases

Coliformes totales externos del huevo. Se encontraron diferencias significativas entre programas nutricionales ($P=0.0094$), donde el programa nutricional 3 presentó la mayor carga (Cuadro 10), lo cual se dio debido a que la mayoría de muestras analizadas del programa nutricional 3 presentaron heces o sangre en su cascarón, representando un mayor riesgo de presencia de microorganismos. Dicho problema fue ocasionado por deficiencia en la calidad del alimento, reportado por la planta encargada de la elaboración del programa nutricional, durante su crecimiento como pollona, lo cual provocó trastornos en su postura y en la salud intestinal, repercutiendo en la puesta de huevos.

Cuadro 10. Recuento promedio de coliformes totales en el cascarón del huevo fresco por programa nutricional.

Programas nutricionales	Media $\pm$ D. E. (Log UFC g ⁻¹)
1	< 1 ^{b&}
2	0.7187 $\pm$ 0.075 ^b
3	1.2575 $\pm$ 0.720 ^a

^{abc} Diferencias significativas entre programas nutricionales.

[&] Todas las muestras presentaron resultados por debajo del límite de detección 1 Log UFC g⁻¹.

Por medio de las heces puede haber una contaminación a otros huevos por contacto, y existe el riesgo de contaminación de *Salmonella* spp. al interior del huevo (Tauson 2002). Los datos por tratamiento en cada fase (cuadro 11) oscilaron entre < 1 y 2.95 Log UFC g⁻¹ los cuales no presentaron diferencias significativas ($P=0.3280$).

Cuadro 11. Recuento de coliformes totales del cascarón de huevo fresco por fases de los tratamientos.^{&α}

Tratamientos	Fases Log UFC g ⁻¹ ± D.E.			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
H1	< 1 ^β	< 1	< 1	< 1
H2	0.85 ± 0.212	< 1	< 1	< 1
H3	2.95 ± 1.916	< 1	< 1	< 1
D1	< 1	< 1	< 1	< 1
D2	< 1	< 1	< 1	< 1
D3	1.56 ± 1.225	< 1	< 1	2.04 ± 1.470

[&]No hubieron diferencias significativas;

^αH y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales.

^βTodas las muestras que reportan <1 se encuentran por debajo del límite de detección 1 Log UFC g⁻¹

Mesófilos aerobios internos de huevos. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 12). La carga microbiana promedio fue 0.760 Log UFC g⁻¹, los cuales se encuentran dentro del límite de criterio establecido por la American Public Health Association (Ricke *et al.* 2001) < 1 Log UFC g⁻¹. La baja carga microbiana se da debido a las barreras antimicrobianas que posee el huevo. El pH promedio de todos los tratamientos fue de 7.6 lo cual concuerda con Pascual y Calderon (2000) y el cual es importante debido a que es una barrera para el crecimiento de los microorganismos. Así también, la cutícula, cáscara, viscosidad del albumen y proteínas antimicrobianas (Rosales *et al.* 2010, Board y Tranter 1995, Ruiz 2010).

No existen parámetros microbiológicos de calidad sanitaria del huevo en las regulaciones de Honduras que nos permitan comparar la carga microbiana, sin embargo, existen países que establecen los siguientes criterios microbiológicos:

- Reglamento Técnico de Costa Rica (2006): permite dos huevos de un muestro de 5 huevos tener una carga entre 4.69 y 6 Log UFC g⁻¹
- American Public Health Association de EEUU (Ricke *et al.* 2001): < 1 Log UFC/g
- Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996: < 5 Log UFC/g
- Norma Sanitaria de Criterios Microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad No. 071 de Perú permite dos huevos de un muestro de 5 huevos tener una carga entre 1 y 2 Log UFC g⁻¹ (MINSA 2008)
- Reglamento Sanitario de los alimentos en Chile N°977/96 permite a dos huevos de un muestro de 5 huevos tener una carga entre 4 y 4.69 Log UFC g⁻¹ (Ministerio de Salud de Chile 1996)

Dentro del estudio se muestra que la mayoría de conteos de mesófilos aerobios estuvieron debajo del límite de todas las normas previamente mencionadas, es por esto que el estudio realizado puede ser una opción para establecer un límite microbiológico de $< 1 \text{ Log UFC g}^{-1}$ de mesófilos aerobios en el contenido de los huevos producidos en jaulas convencionales, ya que se consideraron variables de líneas comerciales de gallinas ponedoras, programas nutricionales comerciales y condiciones ambientales de la zona central del país.

Cuadro 12. Recuento de mesófilos aerobios internos por fases de los tratamientos.[&]

Tratamientos	Media $\pm$ D.E. (Log UFC g ⁻¹)
H1 [®]	0.825 $\pm$ 0.35
H2	0.775 $\pm$ 0.21
H3	< 1
D1	0.85 $\pm$ 0.16
D2	< 1
D3	< 1
CV (%)	23.29

[&] No existen diferencias significativas

[®] H y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales.

Presencia/ausencia de *Salmonella*. No hubo presencia de *Salmonella* spp. en ninguno de los huevos, pero hubo presencia en el concentrado del programa nutricional 3. Las materias primas de fuente animal o vegetal, pájaros, plagas, temperaturas y humedades de almacenamiento, limpieza de instalaciones son factores primordiales en la presencia de *Salmonella* en los concentrados de los programas nutricionales (Creus 2012). Por ende, el programa nutricional es un riesgo potencial a contaminar el huevo debido a la ingesta de un alimento contaminado. Valverde (2012) argumenta que transmisión de *Salmonella* puede darse por medio de la gallina al huevo, debido a una alimentación contaminada o un ambiente contaminado la cual es denominada transmisión vertical. Pero cabe recalcar que no fue transmitida a los huevos del tratamiento.

No se conoce el serotipo de *Salmonella* pero por lo general en aves es *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium, lo que pudo ocurrir fue que la carga microbiana dentro de la gallina no tuvo la capacidad de reproducirse para de esta manera contaminar el huevo, Cogan y colaboradores (2004) mencionan que *Salmonella* enterica serovar Enteritidis no tiene la capacidad de multiplicarse dentro del huevo fresco y su carga debe ser mayor a 6 Log UFC mL⁻¹ para contaminar la yema.

Otra razón sustentada por el estudio de Cogan, se pudo deber a que el serovar de *Salmonella* presente dentro del huevo no poseía flagelos lo que impidió la movilidad hacia la yema, reduciendo su capacidad de reproducirse. Además las barreras antimicrobianas del huevo son un factor que ayudan a restringir el paso de microorganismos hacia la yema (Board y Tranter 1995, Ruiz 2010).

Vida anaquel del huevo. En el cuadro 13, muestra los modelos usado en la vida anaquel, el cual no mostró diferencias significativas, por ende el promedio de vida anaquel microbiológica de todos los tratamientos es de 3.47 semanas, lo cual es aproximadamente 24 días, pero a su vez se muestra la vida anaquel por tratamiento (Cuadro 14). Esto fue determinado en la semana que la carga microbiana de mesófilos aerobios internos fue $> 1 \text{ Log UFC g}^{-1}$. Además, existe una correlación positiva ($P = 0.0205$) de la carga externa de mesófilos aerobios con la carga interna del huevo en la semana 4 de almacenamiento, esto me indica que existe la posible penetración al interior del huevo; es por esto que es importante la carga microbiana externa, lo cual lleva a una proliferación de bacterias. Dentro del análisis de Unidades Haugh (datos no reportados), al comparar el día 0 y la semana 4 se encontraron diferencias significativas ($P = <0.0001$) llegando a 31.37 UH, la cual ya es catalogada como calidad B (USDA 2000) en donde la viscosidad del albumen se ha ido perdiendo con el paso del tiempo debido a pérdida de agua y CO_2 (Rosales *et al.* 2010), lo cual concuerda con Pujols (2012) que las unidades Haugh en la semana 3 y 5 fueron 43.98 y 33.30 UH respectivamente, dentro de las cuales no hubieron diferencias significativas. Además, la viscosidad del albumen es considerada una barrera antimicrobiana (Board y Tranter 1995), es por ende que al haberse perdido en el almacenamiento dió oportunidad a la proliferación de bacterias, esto concuerda con Ruíz (2010) quien argumenta que el envejecimiento fluidifica la clara que deja de soportar y proteger a la yema, que por ende no tarda en contaminarse con la microflora del cascarón.

Cuadro 13. Análisis estadístico de vida anaquel.[&]

	Modelos	Probabilidad
Vida anaquel	Fase	0.4912
	Línea	0.6084
	Programa nutricional	0.8122
	Línea $\times$ Programa nutricional	0.3283
	Línea $\times$ Programa nutricional $\times$ Fase	0.3945

[&] No hubieron diferencias significativas

Cuadro 14. Vida anaquel promedio de los tratamientos.[&]

Tratamientos	Media $\pm$ D. E. (semanas)
H1 [§]	3.38 $\pm$ 0.916
H2	3.25 $\pm$ 1.035
H3	3.63 $\pm$ 0.744
D1	3.38 $\pm$ 0.916
D2	3.88 $\pm$ 0.354
D3	3.38 $\pm$ 0.916
CV (%)	23.95

[&] No hubieron diferencias significativas.

[§] H y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales.

4. CONCLUSIONES

- No existe efecto de la línea y el programa nutricional en la carga de mesófilos aerobios en el interior y exterior del huevo fresco producido en jaulas convencionales.
- La deficiencia en la calidad del programa nutricional puede trastornar el desarrollo de la gallina ponedora afectando la calidad externa del huevo.
- La vida anaquel microbiológica de huevos producidos en jaulas convencionales es de 24 días a 25 ± 3 °C y HR 40-50% basada en su límite de 1 Log UFC g-1 en el interior del huevo y cumpliendo con las regulaciones microbiológicas de ausencia de *Salmonella* spp. en 25 mL.

5. RECOMENDACIONES

- Establecer el plan de muestro del límite microbiológico de recuento de mesófilos internos de huevo en regulaciones sanitarias de alimentos en Honduras.
- Identificar la presencia/ausencia de *Salmonella* spp. en cada paso de la elaboración del programa nutricional y en materias primas.

6. LITERATURA CITADA

Andrew, W., A. Jacobson y T. Hammack, 2011. BAM Chapter 5: *Salmonella*. Consultado: 15 nov 2013. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>

Board, R.G. y H. S. Tranter. 1995. The microbiology of eggs. *In*: W. Stadelman y O.J. Cotterill (eds.) *Egg science and Technology*, 4ta ed. Food Products Press, New York. p 81-103.

Cogan, T.A, F. Jørgensen, H.M. Lappin-Scott, C.E. Benson, M.J. Woodward, T.J. Humphrey. 2004. Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella* enterica serovars in hen eggs. *In*: *Microbiology* 150: 1063-1071.

Colavitti, R., C. Ernest. 2011. Cómo adquirir una mayor vida anaquel en huevos. *Industria Avícola*. EUA. 58(3):10.

Creus, E. 2012. Contaminación por *Salmonella* en los piensos (II): control. (en línea). Consultado 23 de agosto de 2014. Disponible en: http://www.3tres3.com/salmonela/contaminacion-por-salmonella-en-los-piensos-ii-control_30622/

Diario: Tiempo. 2013. En Honduras se consumen 120 huevos por habitante. San Pedro Sula, Honduras, febrero.

De Reu, K. 2006. Bacteriological contamination and infection of shell eggs in the production chain: a review. Instituut voor Landbouw. Ghent, Bélgica. p 21, 22.

Huneau, A., V. Michel, D. Huonnic, L. Balaine y S. Le Bouquin. 2010. Factors influencing bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and free-range systems for laying hens under commercial conditions. *In*: *British Poultry Science*. 51(2):163-169.

Hernández, M. Sastre, A. 1999. *Tratado de nutrición*. Madrid, España, Díaz Santos S.A. p 372-373.

Hy-Line International. 2011. *Hy-line CV22 Manual de Estándares de Rendimiento*. 2ª ed. Iowa, USA. p 13.

INPROVO (Organización Interprofesional del Huevo y sus productos, España). 2003. *El libro del huevo*. 2a ed. Madrid, España, Instituto de Estudios del Huevo. p 39.

Instituto de Estudio del Huevo. 2007. Manejo del huevo y ovoproductos en la cocina. Madrid, España. p 37-39.

Ministerio de Salud de Chile. 1996. Reglamento Sanitario de los alimentos N° 977: Criterios Microbiológicos. Santiago, Chile. p 86.

MINSA. 2008. NTS No 071-2008/MINSA-V.01/DIGESA. Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de Consumo Humano. Perú. P 18-19.

Mundo Agropecuario. 2013. La alimentación de la ponedora y su influencia en la calidad del huevo. (en línea). Consultado 15 de septiembre de 2014. Disponible en: <http://mundoagropecuario.com/la-alimentacion-de-la-ponedora-y-su-influencia-en-la-calidad-del-huevo/>

Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996. Bienes y servicios. Huevos y sus productos y derivados, D.F, México. p 32.

Pascual, M. y Calderón, V. 2000. Microbiología Alimentaria Método Analítica para Alimentos y Bebidas. 2a ed. Díaz de Santos. Madrid, España. p 13,14-17, 273

Pasquali, F., T. Manfreda, P. Olivi, P. Rocculi, F. Sirri, A. Meluzzi. 2012. Modified-atmosphere packaging of hen table eggs: Effects on pathogen and spoilage bacteria. *In: Poultry Science*. 91(12):7 p.

Perez, J.E. y J.I. Pardo. 2006. Control de calidad en carnes. *In* S. Grisolia, E. Tufanisco, M.A. Lopez y F. Bueno (eds) La gripe aviaria: el reto de salud pública. Universidad Castilla-La Mancha, España. p 52.

Puig L. 2013. Calidad de huevo en reproductoras. (en línea). Consultado 29 de octubre de 2014. Disponible en: <http://agrinews.es/2013/12/10/calidad-del-huevo-en-reproductoras-2/>

Pujols, K. 2012. Efecto del recubrimiento con aceite de soya, alfa y beta quitosano y sus combinaciones en emulsión en la calidad y vida anaquel del huevo. Tesis Ing. Agroindustria. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 28 p.

Reglamento Técnico Centroamericano. 2009. Alimentos: Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. p 5, 19.

Reglamento Técnico de Costa Rica. 2006. RTCR 397 Huevos frescos o refrigerados de gallina para consumo humano. 12 p.

Ricke, S., S.G. Birkhold y R.K. Gast. 2001. Egg and Egg products. *In* Pouch, F y K. Ito. (ed) Microbiological examination of foods. 4ta ed. American Public Health Association, Washington, EEUU, Sheridan Books, Inc. p 478.

Rincón, D.P, R.Y. Ramírez, J.C. Vargas.2011. Transmisión de *Salmonella* enterica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *In: Revista de la Universidad de Santander.* 43(2):167-177.

Rosales, E., S. Fernández y P. Ruíz. 2010. Calidad de huevo en reproductoras y su impacto en los nacimientos. (en línea). Consultado 20 de agosto de 2014. Disponible en : <http://www.engormix.com/MA-avicultura/genetica/articulos/calidad-huevo-reproductoras-impacto-t2950/103-p0.htm>

Ruiz, M.D. 2010. Huevo y ovoproductos. *In: A. Gil. (ed.) Tratado de nutrición: composición y calidad nutritiva de los alimentos.* 2da ed. Madrid, Editorial Medica Panamericana. p 79, 93-94.

SAG (Servicio Agrícola y Ganadero).1995. Decreto N° 16 de 1995: Establece límites máximos de contaminantes en insumos destinados a la alimentación animal. Santiago, Chile. p 2.

Stadelman, W. Cotterill, O. 1995. *Egg Science and Technology.* 4th ed. Food Products Press. NY, United States of America. p 81-83,84.

Tauson, R. (2002). Furnished cages and aviaries: production and health. *World's PoultryScience Journal* 58: 49-63.

USDA (United States Department of Agriculture). 2000. *Egg-Grading Manual.* Washington. p 24.

Valverde, C. 2012. Control Microbiológico de Salmonelosis en ponedoras. (en línea). Consultado 2 de septiembre. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_MG%2FMG_2012_244_46_49.pdf

7. ANEXOS

Anexo 1. Recuento de mesófilos aerobios del cascarón de huevo fresco por fases de los tratamientos.

Tratamientos	Log UFC g ⁻¹ ± D.E.			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
H1 [®]	2.88 ± 0.566 ^{&}	3.71 ± 0.481	0.85 ± 0.212	2.46 ± 0.049
H2	2.61 ± 0.000	3.45 ± 0.311	2.10 ± 0.141	2.82 ± 0.099
H3	3.45 ± 1.513	3.51 ± 1.308	1.59 ± 0.834	2.13 ± 0.247
D1	2.71 ± 0.841	3.42 ± 0.304	1.48 ± 0.000	2.17 ± 0.127
D2	3.17 ± 0.240	3.18 ± 0.141	2.30 ± 0.000	2.04 ± 0.056
D3	3.13 ± 0.028	3.45 ± 0.028	0.70 ± 0.000	3.22 ± 0.021

[®] H y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales. [&] No hubieron diferencias significativas

Anexo 2. Recuento de mesófilos aerobios internos de huevo fresco por fases de los tratamientos.

Tratamientos	Log UFC g ⁻¹ ± D.E.			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
H1 [®]	0.85 ± 0.212 ^{&}	0.7 ± 0.000	0.85 ± 0.212	1.0 ± 0.000
H2	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	1.0 ± 0.424
H3	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000
D1	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	1.2 ± 0.707	0.7 ± 0.000
D2	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000
D3	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000	0.7 ± 0.000

[®] H y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales. [&] No hubieron diferencias significativas

Anexo 3. pH del huevo fresco de los tratamientos por fase.

Tratamientos	Media ± D.E.		
	Fase 2	Fase 3	Fase 4
H1 [®]	6.99 ± 0.155	7.27 ± 0.120	7.17 ± 0.021
H2	6.99 ± 0.042	7.21 ± 0.339	7.01 ± 0.035
H3	7.06 ± 0.026	7.57 ± 0.255	7.36 ± 0.078
D1	7.03 ± 0.042	7.10 ± 0.049	6.94 ± 0.064
D2	6.98 ± 0.064	7.21 ± 0.240	7.23 ± 0.148
D3	6.92 ± 0.120	7.34 ± 0.064	7.12 ± 0.099

[®] H y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales.

Anexo 4. Recuento de mesófilos aerobios internos del huevo de los tratamientos durante vida anaquel.

Vida anaquel	Log UFC/g					
	H1 [®]	H2	H3	D1	D2	D3
S0 ^{&}	0.85 ± 0.12	0.78 ± 0.15	0.70 ± 0.00	0.83 ± 0.25	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00
S1	0.70 ± 0.00	0.89 ± 0.23	0.85 ± 0.00	0.81 ± 0.14	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00
S2	0.74 ± 0.08	0.78 ± 0.15	0.78 ± 0.09	0.89 ± 0.37	1.04 ± 0.41	0.70 ± 0.00
S3	0.70 ± 0.00	0.98 ± 0.32	1.59 ± 1.78	0.85 ± 0.12	1.04 ± 1.21	1.38 ± 1.27
S4	1.07 ± 0.42	0.98 ± 0.26	1.83 ± 1.19	1.94 ± 0.72	1.04 ± 0.88	1.11 ± 0.60

[®] H y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales. [&] S: semanas

Anexo 5. Recuento de mesófilos aerobios externos del huevo durante vida anaquel.

Vida anaquel	Log UFC/g					
	H1 [®]	H2	H3	D1	D2	D3
S0 ^{&}	2.47 ± 1.20	2.75 ± 0.56	2.62 ± 0.82	2.44 ± 0.82	2.82 ± 0.43	2.62 ± 1.29
	2.16 ± 0.82	2.62 ± 0.45	2.12 ± 0.78	2.27 ± 0.64	2.70 ± 0.49	2.99 ± 0.27
S2	3.03 ± 0.97	1.84 ± 0.83	2.18 ± 0.52	1.86 ± 0.85	1.96 ± 0.59	2.20 ± 0.27
S3	2.27 ± 0.46	2.69 ± 0.46	3.27 ± 0.53	2.81 ± 0.76	3.66 ± 0.34	3.95 ± 1.28
S4	1.89 ± 0.88	1.49 ± 0.55	2.13 ± 1.70	2.38 ± 1.51	2.70 ± 1.02	2.50 ± 1.69

[®] H y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales. [&] S: semanas

Anexo 6. Recuento de coliformes totales externos del huevo durante vida anaquel.

Vida anaquel	Log UFC/g					
	H1 [®]	H2	H3	D1	D2	D3
S0 ^{&}	0.70 ± 0.00	0.74 ± 0.08	1.14 ± 0.88	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.92 ± 0.43
S1	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.84 ± 0.27	0.70 ± 0.00	0.93 ± 0.45	1.13 ± 0.50
S2	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.78 ± 0.15	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.74 ± 0.08
S3	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	1.39 ± 0.88	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	2.01 ± 1.36
S4	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	1.24 ± 1.08	1.38 ± 0.78

[®] H y D: Hy-line y Dekalb; 1, 2, 3: programas nutricionales. [&] S: semanas