



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Efecto del volteo de la cama sobre la calidad del aire en la cría de pollos de engorde

Tesis de Máster
Valencia, Septiembre 2011

Silvia Vázquez Briz

Director:

Salvador Calvet Sanz

Directora:

Ana Isabel Jiménez Belenguer

Directora:

María Cambra López

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer a todos los que han participado en este trabajo, tanto de manera física o intelectual, como con ayuda de instalaciones o materiales, haciéndolo posible.

En particular, agradecer a mis directores Salva, Ana y María que me han ayudado durante estos meses a conseguir que haya adquirido más conocimientos, sobretodo en el modo de realización de un trabajo de investigación y en materia ambiental.

Al Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA) del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) por ofrecernos sus instalaciones.

A SADA Valencia S.A. por la colaboración en este estudio y al Centro Superior de Investigación en Salud Pública de la Generalitat Valenciana por permitirnos utilizar las instalaciones de la sala de balanzas, en especial a Vicente Lacueva.

A Elisa por su ayuda en el laboratorio y en la recogida de muestras.

A mis padres porque gracias a ellos he podido realizar éste máster.

Por último, a mi pareja, porque es el que más ánimos me ha dado en los momentos de estrés.

Resumen

La calidad del aire en alojamientos ganaderos es un factor clave tanto para la salud, productividad y bienestar animal, como para la salud humana y el medio ambiente. Las características de la cama en estos alojamientos puede modificar esta calidad. El objetivo de este estudio es evaluar la técnica de volteo de la cama durante el ciclo productivo de pollos de engorde, en cuanto a las concentraciones interiores y tasas de emisión de distintos contaminantes atmosféricos. El trabajo se realizó en una granja experimental de pollos de engorde durante dos ciclos consecutivos. La granja tenía 3 salas, dos salas con tratamiento (volteo semanal) frente a una sala control (sin volteo). Se registraron semanalmente los parámetros ambientales, las características de la cama y las concentraciones y emisiones de material particulado (TSP, PM10 y PM2,5), de microorganismos suspendidos en el aire (viables aerobios mesófilos, mohos y levaduras, y enterobacterias) y de gases (amoníaco, dióxido de carbono y óxido nitroso). Todos los contaminantes aumentaron con la edad de los animales y evolucionaron de forma similar entre tratamientos. Además se observó una evolución similar entre microorganismos en la cama y en el aire. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para ningún contaminante estudiado, tanto físicos como biológicos. Este resultado puede explicarse por un contenido de materia seca de la cama elevado en este estudio, comparado con granjas comerciales. No obstante, se observó un aumento puntual en la concentración de material particulado en los momentos de volteo. Las implicaciones de la técnica del volteo de la cama sobre la salud humana y animal y sobre el medio ambiente deben ser evaluadas en mayor profundidad.

Abstract

Air quality in livestock housing is a key factor for animal health, productivity and welfare, as well as for human health and the environment. The characteristics of the litter used to rear broilers can affect air quality inside the farm. The objective of this study was to evaluate litter aeration during the broiler rearing cycle, regarding indoor concentrations and emission rates of different atmospheric pollutants. The study was performed in an experimental broiler farm during two consecutive cycles. The housing had three rooms, two of which were assigned to the litter aeration treatment, while the other served as control. The environmental parameters, litter characteristics, and concentrations and emissions of airborne particulate matter (TSP, PM10 and PM2.5), airborne microorganisms (mesophyllic viable bacteria, moulds and yeasts and *Enterobacteriaceae*) and gases (ammonia, carbon dioxide and nitrous oxide) were

measured. All pollutants increased with the bird age and their evolution in time was similar between treatments. Furthermore, a similar evolution was observed between microorganisms in the litter and in the air. There were no statistically significant differences between treatments for any studied physical or biological pollutant. This result could be due to the high dry matter content of the litter in our study, compared with commercial farms. However, isolated increases of particulate matter concentration were found during the litter aeration process. The implications of litter aeration on human and animal health and the environment should be evaluated in more depth.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La calidad del aire en granjas de pollos	1
1.2. Material particulado en el aire	2
1.2.1. Definición	2
1.2.2. Relación con la producción ganadera.....	2
1.2.3. Efectos en la salud.....	3
1.2.4. Efectos en el medio ambiente.....	3
1.3. Microorganismos suspendidos en el aire: bioaerosoles	4
1.3.1. Definición	4
1.3.2. Relación con la producción ganadera.....	4
1.3.3. Efectos en la salud.....	5
1.3.4. Efectos en el medioambiente.....	6
1.4. Gases	6
1.4.1. Descripción general	6
1.4.2. Amoníaco y sus efectos	7
1.4.3. Dióxido de carbono y óxido nítrico y sus efectos.....	8
1.5. El volteo como alternativa	9
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Alojamiento y material animal.....	11
3.2. Registros	13
3.3. Medición de parámetros ambientales.....	13
3.4. Caracterización de la cama	14
3.4.1. Análisis físico-químico	14
3.4.2. Análisis microbiológico.....	14
3.5. Concentraciones de material particulado	15
3.5.1. Tapered element oscillating microbalance (TEOM).....	15
3.5.2. Gravimetría: RespiCon	16
3.6. Concentraciones de microorganismos en aire	18
3.7. Concentraciones de gases	19
3.8. Análisis de datos	20
3.8.1. Cálculo de emisiones.....	20
3.8.2. Efecto del volteo	20
4. RESULTADOS	22
4.1. Parámetros ambientales	22

4.2. Caracterización de la cama	23
4.2.1. Parámetros físico-químicos	23
4.2.2. Recuentos de viables mesófilos aerobios en cama	24
4.2.3. Recuentos de Enterobacterias en cama	26
4.3. Material particulado	28
4.3.1. Concentraciones de material particulado.....	28
4.3.2. Emisiones de material particulado	30
4.4. Microorganismos	31
4.4.1. Recuentos de viables mesófilos aerobios en aire.....	31
4.4.2. Viables mesófilos aerobios: emisiones	32
4.4.3. Recuentos de Mohos y Levaduras en aire	33
4.4.4. Mohos y levaduras en aire: emisiones.....	34
4.4.5. Recuentos de Enterobacterias en aire.....	35
4.4.6. Enterobacterias en aire: emisiones.....	36
4.5. Gases	37
4.5.1. Concentración de NH ₃	37
4.5.2. Emisión de NH ₃	38
4.5.3. Concentración de CO ₂	39
4.5.4. Emisión de CO ₂	40
4.5.5. Concentración de N ₂ O	41
4.5.6. Emisión de N ₂ O.....	42
5. DISCUSIÓN	44
5.1. Parámetros ambientales	44
5.2. Parámetros físico-químicos de la cama	44
5.3. Material particulado suspendido en el aire	44
5.4. Microorganismos en la cama y el aire	46
5.5. Gases	47
6. CONCLUSIONES	50
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
8. ANEJOS	59
Anejo 1: Calendario del experimento	59
Anejo 2: Composición de los medios de cultivo	60
Anejo 3: Siembra de las muestras.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros ambientales durante el ciclo 1 en el interior de las salas: temperatura interior (T int) y humedad relativa (HR int) y en el exterior (T ext y HR ext) y flujos de ventilación (V) en las salas control (C) y tratamiento con volteo (T)	22
Tabla 2. Parámetros ambientales durante el ciclo 2 en el interior de las salas: temperatura interior (T int) y humedad relativa (HR int) y en el exterior (T ext y HR ext) y flujos de ventilación (V) en las salas control (C) y tratamiento con volteo (T)	23
Tabla 3. Características físico-químicas de la cama para el ciclo 1: materia seca (MS), cenizas (Cen), Nitrógeno Kjeldahl (N) y pH.....	24
Tabla 4. Características físico-químicas de la cama para el ciclo 2: materia seca (MS), cenizas (Cen), Nitrógeno Kjeldahl (N) y pH.....	24
Tabla 5. Concentraciones de PM _{2,5} , PM ₁₀ y TSP (mg/m ³) en momentos puntuales del ciclo 1 (semana 3 a la 6) para las salas tratamiento y la sala control.	28
Tabla 6. Emisiones de MP por día y animal (mg/día/animal) en momentos puntuales del ciclo 1(semana 3 a la 6) para las salas tratamiento y la sala control.....	30
Tabla 7. Lectura de enterobacterias (UFC/m ³) de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.....	36
Tabla 8. Lectura de enterobacterias (UFC/h por animal) de la muestra obtenida a partir de la cuantificación de enterobacterias, ventilación y número de animales de la nave experimental durante el segundo ciclo, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.....	37
Tabla 9. Emisiones medias de NH ₃ , CO ₂ y N ₂ O (mg/animal/h) en el ciclo 1 y 2, diferenciando tratamiento y control.....	48
Tabla 10. Revisión de datos experimentales de las emisiones de NH ₃ de la producción de broilers en el periodo de engorde (Calvet, <i>et al.</i> , 2011).....	48
Tabla 11. Calendario con las actividades realizadas en las salas de tratamiento (T, T1 y T2) y control (C).....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de distribución de salas y equipos durante el periodo experimental	11
Figura 2. Vista general de una de las salas de la nave experimental de cebo aviar conteniendo las líneas de bebederos y de comederos	12
Figura 3. Máquina utilizada para realizar el volteo de la cama y detalle de las cuchillas metálicas.....	13
Figura 4: Anemómetro de conducto para medida del flujo de ventilación	14
Figura 5. Equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM).....	15
Figura 6. Bomba manual de succión e impactadores en cascada (RespiCon)	16
Figura 7 Impingers situados en una sala	19
Figura 8. Medidor fotoacústico para determinación de gases.	19
Figura 9. Lectura de microorganismos mesófilos aerobios de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.....	25
Figura 10. Placa Petri conteniendo colonias de microorganismos mesófilos aerobios en medio de cultivo PCA tras 48 horas de incubación.	26
Figura 11. Lectura de enterobacterias procedentes de las muestras de cama durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control..	27
Figura 12. Placa Petri conteniendo colonias de enterobacterias en medio de cultivo VRBG tras 24 horas de incubación.	27
Figura 13. Evolución a lo largo del ciclo 1 (días 11 al 35) de la concentración diaria de PM10 (mg/m ³) para las salas tratamiento y la sala control y los momentos de volteo de la cama obtenida mediante el TEOM	29
Figura 14. Evolución a lo largo del ciclo 2 (días 11 al 35) de la concentración diaria de PM10 (mg/m ³) para las salas tratamiento y la sala control y los momentos de volteo de la cama obtenida mediante el TEOM	29
Figura 15. Lectura de micoorganismos aerobios mesófilos de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.....	32

Figura 16. Lectura de microorganismos aerobios mesófilos de la muestra obtenida a partir de la cuantificación de AM, ventilación y número de animales de la nave experimental durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.....	33
Figura 17. Lectura de mohos y levaduras de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.....	34
Figura 18. Placa Petri conteniendo colonias de mohos y levaduras en medio de cultivo SB a las 24 horas de incubación	34
Figura 19. Lectura de mohos y levaduras de la muestra obtenida a partir de la cuantificación de hongos y levaduras, ventilación y número de animales de la nave experimental durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.....	35
Figura 20. Concentración media diaria de NH ₃ (mg/m ³) durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento	38
Figura 21. Emisión de NH ₃ diario en mg/animal/h durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento.....	39
Figura 22. Concentración del gas CO ₂ diario en mg/m ³ durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento	40
Figura 23. Emisión del gas CO ₂ diario en mg/animal/h durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento	41
Figura 24. Concentración del gas N ₂ O diario en mg/m ³ durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento	42
Figura 25. Emisión del gas N ₂ O diario en mg/animal/h durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento	43
Figura 26. Método de siembra de muestra de aire	65
Figura 27. Método de siembra de muestra de cama	66

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La calidad del aire en granjas de pollos

Uno de los principales retos de la ganadería en la actualidad, y en particular de las granjas de pollos, es preservar la calidad del aire tanto en el interior de los alojamientos como en el aire ambiente del exterior. Se trata de preservar la calidad del aire en cuanto al material particulado suspendido, microorganismos y gases, ya que estos compuestos y organismos pueden ser nocivos para la salud humana y animal, y para el medio ambiente. Por una parte, cada vez existe mayor conciencia de protección ambiental, que se traduce en unas regulaciones legislativas medioambientales más estrictas, como por ejemplo la Directiva 2001/81/CE, sobre techos nacionales de emisión, y la Directiva 2008/50/CE relativa a la calidad de aire ambiente. Por otra parte a nivel de granja resulta importante mantener la calidad del aire para proteger la salud y el bienestar de los animales evitando por tanto un descenso de la productividad (Al Homidan *et al.* 2003). Dicha productividad es muy alta en granjas de pollos, ya que ésta ha tenido un rápido crecimiento debido al continuo desarrollo de los sistemas de producción intensiva y la mejora genética, que han conseguido un incremento en la eficiencia alimentaria logrando tasas de crecimiento muy elevadas (McKay, 2008). Sin embargo, los pollos de engorde no consiguen desarrollar este potencial genético en un ambiente de mala calidad. Además, la calidad del aire en el interior de las granjas está altamente influida por la calidad de la cama en la que se encuentran los animales. Las características y el manejo de ésta son por tanto cruciales para explicar las cantidades de contaminantes emitidos, y a su vez condiciona el estado sanitario de la explotación (Ritz *et al.*, 2005).

Debido a la gran influencia que la calidad de la cama ejerce sobre las condiciones ambientales y sanitarias en las granjas de pollos de engorde, se han utilizado distintos métodos para mejorar la calidad de la cama, entre ellos la técnica de aireación de la cama mediante volteo. Esta técnica se ha utilizado principalmente para disminuir el contenido en humedad de la cama y así reducir las lesiones en las patas de los pollos y los procesos de descomposición anaerobia que dan lugar a malos olores (ASABE, 2007). Sin embargo, por sus características, esta labor podría tener efectos adversos en la calidad del aire como el aumento puntual o a largo plazo de concentraciones y emisiones de material particulado, microorganismos y gases. Además, se desconoce en qué medida esta técnica altera los valores habituales de

concentración y emisión de contaminantes durante el ciclo productivo de pollos de engorde. Así pues, este trabajo experimental pretende aportar información al respecto.

1.2. Material particulado en el aire

1.2.1. Definición

El material particulado (MP) en el aire se define como una mezcla de partículas suspendidas con diferentes características físicas, químicas y biológicas. El MP se utiliza como indicador de calidad del aire, refiriéndose a partículas sólidas o líquidas suspendidas en un medio gaseoso (Cambra-López *et al.*, 2010; EPA, 2004). La calidad del aire en las granjas depende principalmente de dos fracciones de tamaño de MP: PM₁₀ y PM_{2,5} (del inglés "Particulate Matter"). Estas fracciones de tamaño se definen como partículas que pasan a través del cabezal de tamaño selectivo para un diámetro de 10 µm (PM₁₀) ó 2,5 µm (PM_{2,5}), con una eficiencia de corte del 50%. Al total de MP en un medio gaseoso se le denomina masa total de partículas suspendidas (del inglés "Total Suspended Particulate Matter", TSP) (RD 102/2011; Cambra-López *et al.*, 2010).

1.2.2. Relación con la producción ganadera

Las actividades agrarias en general y la producción ganadera en particular pueden emitir unas cantidades considerables de MP a la atmósfera (Takai *et al.*, 1998). No obstante, las partículas del aire encontradas en los alojamientos ganaderos y las partículas encontradas en otras ubicaciones o ámbitos agrarios pueden variar. Las principales diferencias que encontramos son unas concentraciones entre 10 y 100 veces más altas en la ganadería que en otros ambientes, además de ser portadoras de gases, olores, y contener una gran variedad de microorganismos (Zhang, 2004). Además, estas partículas pueden contener otras sustancias como metales pesados, componentes orgánicos volátiles, nitratos, sulfatos y amoníaco (Martin *et al.* 2008; Schneider *et al.*, 2001).

El origen principal del MP en granjas de pollos en las fracciones de tamaño de PM₁₀ y PM_{2,5}, son las plumas y las deyecciones (Cambra-López, *et al.*, 2011). Las concentraciones de las distintas fracciones de MP son dependientes del tipo y edad de explotación, estación del año, periodo de muestreo, actividad animal, densidad y condiciones de manejo, tipo de ventilación, tipo de cama, temperatura e higiene (Ellen *et al.*, 2000).

1.2.3. Efectos en la salud

La eficiencia de la producción y bienestar de las aves en relación con la calidad del aire se ha publicado en distintos estudios (Feddes *et al.*, 1995; Quarles and Caveny, 1979). El MP afecta a la salud y bienestar tanto de animales como de las personas, especialmente a través de enfermedades respiratorias, siendo éstas las más comunes en las explotaciones ganaderas (Andersen *et al.*, 2004). Los efectos de MP sobre las vías respiratorias son: irritación del tracto respiratorio por una reducción de la inmunidad o por compuestos presentes en el MP, y por inhalación de microorganismos patógenos o no patógenos, además de posibles reacciones alérgicas (Harry, 1978)

Las partículas que entran al sistema respiratorio de los humanos son depositadas en diferentes regiones de acuerdo con su tamaño. Mientras las partículas de mayor tamaño pueden ser depositadas en la región de la nariz y faríngea (inhalables), sólo las de diámetros de menos de 10-15 μm pueden entrar en el árbol traqueobranquial (torácicas) y sólo las que tienen un diámetro aproximadamente menor de 4 μm pueden llegar a los alveolos pulmonares (respirables) (ISO, 1995; EN, 1993). Estas últimas, las más finas, son las más peligrosas para el ser humano, ya que además de poder causar enfermedades respiratorias graves, las partículas de diámetro menor a 1 μm están implicadas en enfermedades cardiovasculares (Tucker, 2000). Los más afectados por estas enfermedades respiratorias son los trabajadores avicultores, que pueden sufrir enfermedades profesionales, que se recogen en el Real Decreto 1299/2006: Rinoconjuntivitis, asma, síndrome de disfunción reactivo de la vía aérea, fibrosis intersticial difusa y neumonía intersticial difusa.

1.2.4. Efectos en el medio ambiente

Respecto al medio ambiente, el MP puede reducir la visibilidad, causar estrés vegetativo y alterar los ecosistemas (Grantz *et al.*, 2003). Este contaminante es relevante en el cambio climático, ya que contribuye a la dispersión y absorción de la radiación solar e infrarroja en la atmósfera (IPCC, 2005). Además el MP está relacionado con el transporte y emisión de malos olores (Hartung *et al.*, 1986, Williams, 1989, Hoff *et al.*, 1997); también puede estar asociado a la absorción de gases como el amoniaco, provocando problemas en el medio ambiente (Banhazi *et al.*, 2008; Takai *et al.*, 2002).

1.3. Microorganismos suspendidos en el aire: bioaerosoles

1.3.1. Definición

Los bioaerosoles son una suspensión de partículas biológicas transportadas por el aire. Se definen como partículas biológicas como microorganismos vivos o muertos o sus fragmentos, los cuales pueden incluir endotoxinas, micotoxinas, partes de insectos, polen, grano y proteínas microbianas (Cox and Wathes, 1995). Los bioaerosoles pueden clasificarse como submicrones, bioaerosoles de menos de 0,02 μm de diámetro (virus, endotoxinas y micotoxinas), multimicrones, 0,2-50 μm de diámetro (bacterias, hongos, parásitos y algas).

Estas partículas transportadas vía aérea se diferencian según su estado físico, en partículas líquidas (como gotas de líquido) o sólidas (como material seco) y se encuentran suspendidas en el aire individualmente, agrupadas, o acompañadas de materia orgánica, moviéndose a distancias cortas y largas mediante corrientes de aire grandes y pequeñas. (Jones y Harrison, 2004; Mogens y Hovmøller, 2002; Lighthart y Mohr, 1994).

1.3.2. Relación con la producción ganadera

Particularmente, los bioaerosoles generados en la producción animal difieren significativamente de los que se originan en otros sectores, debido a las características propias de los animales que los producen y a la presencia de materia orgánica procedente de sus actividades biológicas. Especialmente, hay altas cantidades de bioaerosoles en la producción avícola, y por lo tanto es uno de los factores más importantes de contaminación del aire en la cría de pollos de engorde (Baykovand y Tyrawska, 1991; Seedorf *et al.*, 1998).

La concentración de microorganismos en el aire interior depende de distintos factores: alojamiento (tipo y edad de la explotación), número de animales, tipo de sistemas de ventilación y calefacción y condiciones ambientales (temperatura, humedad, gases, iluminación, concentración de MP) (Bieszczad y Sobota, 1999; Lange *et al.*, 1997; Shaffer y Lighthart, 1997;).

El origen de los microorganismos en aire se encuentra en el alimento, la cama, los propios animales y su manejo en la granja (Takai *et al.*, 1998). Según estos autores, entre estos microorganismos participan bacterias patógenas de distintas especies (*Staphylococcus aureus*, *Bordetella spp*, *Salmonella.spp*. y *Mycoplasma spp*)

y hongos (*Aspergillus spp*, *Penicillium spp* y *Mucor spp*) pudiendo afectar a la salud humana y animal.

El tiempo de permanencia en el aire de los microorganismos es un factor clave, siendo éste dependiente de sus formas, tamaños y de la potencia de las corrientes aéreas que los sostienen. Asimismo, la permanencia en el aire de estos organismos vivos disminuye rápidamente al alejarse de su origen, siendo más acusada esta disminución cuanto más bajo se encuentren del centro de la fuente. El resultado es el depósito en el suelo de las partículas suspendidas.

La resistencia de los microorganismos obedece a su clasificación: las esporas son las formas de vida con la mayor supervivencia como consecuencia de su bajo metabolismo y sus cubiertas de protección, por lo que no requieren nutrientes externos para mantener su vida durante un largo período de tiempo. Por otro lado, las bacterias muestran una resistencia variable, a causa de su diversa estructura y metabolismo, siendo las bacterias Gram negativas las menos resistentes ya que su pared celular es más fina que la de las Gram positivas (De la Rosa *et al.*, 2002).

Otros factores que intervienen en su supervivencia son: humedad relativa, temperatura, oxígeno, materia orgánica y radiaciones. La humedad relativa es el factor más importante ya que cuando ésta decrece, disminuye el agua disponible para los microorganismos, causando deshidratación y por tanto la inactivación de muchos de ellos. La temperatura está muy relacionada con el factor anterior, el incremento por encima de la temperatura máxima para el microorganismo disminuye su viabilidad, por el contrario, la congelación no conlleva su destrucción pero si evita su multiplicación y el frío, generalmente, disminuye su velocidad de crecimiento (Mohr, 1997). La presencia de oxígeno, la materia orgánica en suspensión y las radiaciones determinan también la supervivencia de los microorganismos en el aire (De la Rosa *et al.*, 2002).

1.3.3. Efectos en la salud

Como consecuencia de ésta contaminación, principalmente microbiana, los animales y trabajadores que se encuentran en estas explotaciones pueden verse afectados a través de procesos de infectividad, alergenicidad y toxicidad entre otros (Hirst, 1995).

Entre los microorganismos patógenos más importantes suspendidos en el aire encontramos los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, presentes en el tracto gastrointestinal de estas aves. Son bacterias Gram negativas que fermentan glucosa y otros azúcares, también se clasifican como bacterias oxidasa-negativa, catalasa

positiva, anaerobios facultativos y no esporulados (Quinn, *et al.*, 2002). A esta familia pertenecen distintos patógenos productores de zoonosis en el hombre. Una de las zoonosis más estudiadas es la salmonelosis, que puede provocar toxiinfección en humanos fundamentalmente por consumo de huevos o de carne de pollo y contaminación cruzada (Yan *et al.*, 2003). Los serotipos más importantes que provocan esta zoonosis son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*.

El otro grupo de microorganismos pertenecen al reino Fungi y se clasifican morfológicamente en dos tipos de organismos: hongos y levaduras. Los hongos crecen como filamentos ramificados llamados hifas (2 a 10 μm de diámetro) o formando redes (micelio) mientras que las levaduras, unicelulares, tienen una apariencia esférica u oval (3 a 5 μm de diámetro). Los hongos filamentosos producen numerosas esporas que se dispersan por el aire. Otro tipo de clasificación de las especies fúngicas es según la relación con su hospedador, pudiendo ser saprófitas, parasíticas o mutualistas. Las especies saprófitas, como *Aspergillus* se encuentran en el ambiente, en polvo y aire, y se mezclan con la materia orgánica en descomposición, causando ocasionalmente infecciones oportunistas en animales y humanos (Quinn, *et al.*, 2002). Esta exposición está relacionada con alergia y asma, alterando el sistema inmune (WHO, 2007).

1.3.4. Efectos en el medioambiente

Una consecuencia de la contaminación del aire en las explotaciones de pollos de engorde, es la salida de los contaminantes al exterior debido a los sistemas de extracción del aire procedente de las granjas, causando una dispersión de los microorganismos a largas distancias con el riesgo de ocasionar infecciones o alergias a otros animales o personas (Baykov y Tyrawska, 1991; Baykov y Stoyanov, 1999) pudiendo llegar a ser un problema de Salud Pública.

1.4. Gases

1.4.1. Descripción general

La producción animal es fuente de diversos contaminantes gaseosos, entre los que destacan el amoníaco (NH_3), dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O) y metano (CH_4). Estos gases pueden agruparse según sus efectos en gases de efecto invernadero (CO_2 , N_2O y CH_4), por una parte (Solomon *et al.*, 2007), mientras que el NH_3 se considera un gas importante debido a sus efectos como la acidificación y eutrofización del medio (Krupa, 2003), así como con un elevado poder irritante que

puede afectar a los trabajadores de las granjas y a los propios animales (Roney et al., 2004).

En los siguientes apartados se indica detalladamente los efectos de las emisiones de cada uno de estos gases, así como su origen en las granjas de pollos. No se incluye el CH₄ por ser un gas emitido en bajas cantidades por este tipo de explotaciones (Roumeliotis *et al.*, 2010).

1.4.2. Amoníaco y sus efectos

El sector ganadero y agrícola contribuye a las mayores cantidades de emisiones de amoníaco, suponiendo en 2006 un 90% del total de emisiones en la Unión Europea (EEA, 2008). Dada su importancia en el medio ambiente, las emisiones de este gas han sido ampliamente estudiadas en diferentes especies ganaderas (Groot Koerkamp *et al.*, 1998).

El NH₃, en las granjas, se origina de las heces y la orina excretados por los animales. En el caso concreto de las aves, el nitrógeno (N) de las excreciones se encuentra en forma de ácido úrico y de las proteínas indigeribles, presentándose un porcentaje de N con un porcentaje aproximado de 70 y 30 respectivamente. El ácido úrico es un compuesto algo más complejo que la urea, y en su descomposición entran en juego un mayor número de enzimas, siendo la más importante, por ser el factor limitante, la uricasa (Groot Koerkamp, 1994).

Tras la descomposición del ácido úrico, la emisión de NH₃ se produce por volatilización de este gas. Este proceso de emisión está afectado por parámetros como son el material de cama, temperatura, humedad de la cama, ventilación y técnicas de manejo (Elliott y Collins, 1982; Patterson y Adrizal, 2005). Así pues, las técnicas que modifican el estado del material de cama utilizado pueden alterar también de forma sustancial la emisión de NH₃.

Entre los efectos de este gas podemos distinguir entre efectos sobre la salud humana y animal y efectos ambientales (acidificación y eutrofización). Los efectos del NH₃ en la salud humana están relacionados con el carácter irritante de este gas, afectando a las mucosas y pudiendo provocar enfermedades leves o graves de las vías respiratorias según la concentración y el tiempo de exposición. Por ello se recomiendan unos niveles de seguridad para las personas de 10 ppm para una exposición a corto plazo y 2 ppm a largo plazo (Roney et al., 2004).

Por último el NH_3 afecta a los propios animales, disminuyendo su crecimiento debido a un menor consumo de alimento, pudiendo causar problemas respiratorios y de visión y alteración del comportamiento, lo que conlleva a una pérdida económica para el ganadero (Pescatore *et al.*, 2005).

En cuanto a los efectos ambientales puede destacarse la acidificación, que se debe a la deposición del nitrógeno amoniacal en los suelos. Las reacciones del NH_3 depositado en suelos implican la liberación de protones que acidifican el medio. Esta acidificación está estrechamente unida con la pérdida de fertilidad de los suelos (Reuss and Johnson 1986; Krupa, 2003).

Otro efecto que afecta al ambiente es la eutrofización, que es el proceso de enriquecimiento excesivo de nutrientes (en este caso Nitrógeno) en las aguas. Este enriquecimiento desequilibra los ecosistemas dando lugar a problemas asociados con el crecimiento excesivo de algas o cianobacterias. Esta invasión evita el crecimiento de otras plantas acuáticas ya que compiten por la luz y los nutrientes (Pidwirny, 2006).

1.4.3. Dióxido de carbono y óxido nitroso y sus efectos

Como hemos mencionado anteriormente el CO_2 y el N_2O se clasifican como gases de efecto invernadero (GEI), los cuales son constituyentes de la atmósfera que absorben y emiten radiaciones infrarrojas. Así, estos gases y el vapor de agua absorben radiaciones con longitudes de onda pertenecientes al espectro infrarrojo, evitando la salida de parte de la radiación terrestre hacia el exterior (Seinfeld y Pandis, 1998).

La agricultura es un sector con una gran importancia en las emisiones de GEI, observando que el porcentaje de emisiones es de un 11,6% en España respecto al resto de sectores industriales (MARM, 2010). A las concentraciones habituales en granjas, estos gases no tienen ningún efecto sobre la salud humana o animal. Sin embargo, sus emisiones sí que son muy relevantes para el cambio climático, teniendo el N_2O un efecto en el calentamiento climático 310 veces mayor que el CO_2 (Salomon *et al.*, 2007).

El CO_2 es un gas que se origina de manera proporcional a la producción metabólica de calor, y por lo tanto al peso corporal de las aves, el cual está afectado por la temperatura y la actividad del animal (CIGR, 2002).

Por último, el N_2O está relacionado con el ciclo del N en la agricultura, que se produce un proceso de nitrificación y desnitrificación en el manejo del estiércol en

condiciones que permiten un bajo nivel de oxígeno, convirtiendo el NH_3 en un gas inerte (N_2), el cual contribuye a la destrucción de la capa de ozono (Costa y Guarino, 2009).

1.5. El volteo como alternativa

Una solución para mejorar la calidad del aire en las granjas es reducir el contenido en humedad de la cama de los pollos y así incrementar la calidad de ésta.

La humedad de la cama está principalmente influida por su gestión, por ejemplo, la práctica de la reutilización de la cama, que se realiza en países como Estados Unidos, puede provocar un incremento en la humedad de ésta (Calvet *et al.*, 2011). El contenido de humedad también depende del material utilizado, disminuyendo cuando éste es muy absorbente (Ritz *et al.*, 2005). Además de la calidad del aire, un gran contenido en humedad de la cama puede aumentar las lesiones en los pollos, provocando en mayor medida problemas de patas (Harms *et al.*, 1977).

Por ello, la técnica de aireación o volteo de la cama se ha utilizado para reducir de forma eficaz esta humedad. Ocasionalmente esta técnica se ha usado en la gestión estiércoles, por ejemplo para reducir malos olores por reducción de la descomposición anaerobia (ASABE, 2007). Además, este proceso ha sido estudiado por su capacidad de reducción de la concentración de NH_3 gaseoso en las salas de pollos (Allen *et al.*, 1998; van Middelkoop, 1994). Sin embargo, como comentábamos en el epígrafe 1.1, a pesar de estos beneficios, la aireación mediante volteo puede aumentar la cantidad de compuestos emitidos al aire con implicaciones para la salud de los animales y de los trabajadores, favoreciendo la suspensión al aire de MP, microorganismos y gases de forma puntual o de forma continuada.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la técnica de volteo de la cama sobre la calidad del aire en la cría de pollos de engorde, en cuanto a las concentraciones interiores y las tasas de emisión al exterior de los siguientes contaminantes físicos y biológicos:

- Material particulado (TSP, PM10 y PM2,5) suspendido en el aire
- Microorganismos (viables aerobios mesófilos, enterobacterias, mohos y levaduras) presentes en el aire
- Gases: NH₃, N₂O, y CO₂

Además, se pretende caracterizar las condiciones ambientales y los cambios en la composición microbiológica y físico-química de la cama durante la técnica del volteo, así como su relación con las concentraciones interiores y tasas de emisión al exterior de estos contaminantes en el aire.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Alojamiento y material animal

El trabajo se llevó a cabo en la nave experimental de cebo aviar del Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA) del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), ubicado en Segorbe (Castellón). La nave consta de 3 salas (Sala 1, 2 y 3), cada una tiene unas dimensiones de 13 m x 6 m (**Figura 1**). En cada uno de los experimentos, dos salas se sometieron a volteo y la otra se utilizó como sala control, es decir, en una de las salas no se realizó el volteo en ningún momento, siguiendo el proceso habitual en granjas comerciales. Se realizaron dos experimentos consecutivos (réplicas) repartidos de la siguiente forma:

- Réplica 1 (primer ciclo): Noviembre-Diciembre de 2010: Sala 2 control y salas 1 y 3 con tratamiento de volteo
- Réplica 2 (segundo ciclo): Enero-Febrero de 2011: Sala 3 control y salas 1 y 2 con tratamiento de volteo

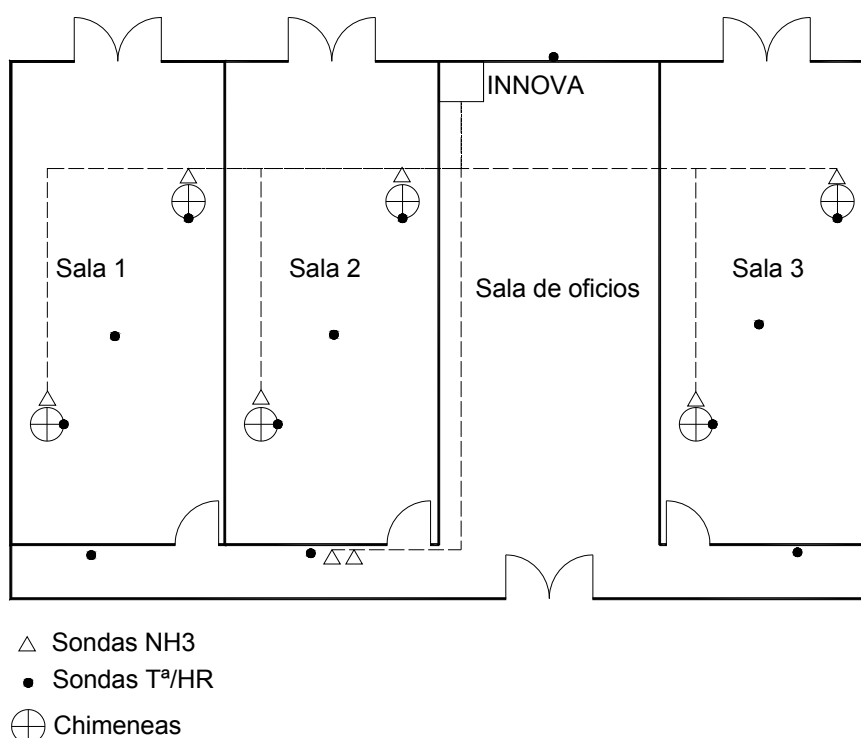


Figura 1. Esquema de distribución de salas y equipos durante el periodo experimental

Todas las salas se llenaron con 800 pollitos machos de un día, siendo la duración del primer ciclo de 46 días y de 44 días en el segundo. Cada sala contaba

con tres líneas de bebederos de tetina con cazoleta y la alimentación se realizó mediante dos líneas de comederos como muestra la **Figura 2**. La alimentación de los animales durante ambos ciclos fue *ad libitum*. El pienso administrado fue el convencional, de tres tipos distintos: arranque (desde el día 0 a la tercera semana), engorde (semana 3 hasta la 5) y retirada (desde la sexta semana hasta el final del ciclo), controlándolo de manera diaria. Una vez a la semana, se pesó el pienso que quedaba en los comederos y en la tolva con el objeto de valorar el consumo de alimento. Ese mismo día, se registraba el valor del contador de agua. Asimismo, semanalmente se pesaron 50 animales de cada sala para monitorizar el crecimiento de los animales. La cama utilizada fue viruta de madera, con una profundidad aproximada entre 8 y 10 cm.

En cada sala la ventilación se realizó de forma mecánica mediante dos extractores de tipo chimenea. El control de la ventilación y la calefacción en cada sala fue convencional para no alterar intencionadamente las condiciones de la cama.

En las dos salas con tratamiento de volteo, se realizaron volteos semanales de la cama desde la cuarta semana del ciclo hasta el final del mismo (4 volteos por ciclo). Dicho volteo se realizó utilizando una máquina diseñada para remover el material de cama (Benza, ER73AV), compuesta con un eje giratorio de cuchillas metálicas (**Figura 3**). Para simular su uso recomendado en granjas, el volteo se realizó en la segunda fase del ciclo de cebo (las últimas 4 semanas). No se realizó durante las primeras semanas porque la cama se encontraba muy seca y no presentaba las condiciones adecuadas para que esta técnica fuera eficaz.



Figura 2. Vista general de una de las salas de la nave experimental de cebo aviar conteniendo las líneas de bebederos y de comederos



Figura 3. Máquina utilizada para realizar el volteo de la cama y detalle de las cuchillas metálicas.

3.2. Registros

El protocolo a seguir fue el mismo en las 2 réplicas. En cada réplica se evaluaron parámetros relacionados con las características de la cama y la calidad del aire, que fueron:

- Condiciones ambientales: temperatura y humedad relativa del aire, así como caudales de ventilación
- Cama: Nitrógeno Kjeldahl, pH, materia seca y cenizas
- Material particulado: TSP, PM10 y PM2,5
- Microorganismos: viables aerobios mesófilos, enterobacterias, mohos y levaduras
- Gases: NH₃, N₂O y CO₂

Para cada réplica se siguió un calendario, que se representa en el Anejo 1, en el que se detallan las actividades a realizar cada día del ciclo productivo.

3.3. Medición de parámetros ambientales

La temperatura y humedad relativa se registró mediante sensores (HOBO U12 Pocasset, EEUU) en el interior (3 por cada sala) y exterior, tanto a la entrada del aire en las salas como en el exterior de las instalaciones. La frecuencia de medida fue de 5 minutos.

Durante todo el ciclo de producción, se registró el caudal de ventilación en cada sala. La tasa de ventilación se registró con anemómetros de conducto (EXACTFAN56, Exafan, España; **Figura 4**) instalados en una de las dos chimeneas de ventilación en cada sala. Cada anemómetro de conducto fue calibrado *in situ* para obtener su caudal de ventilación en función de su frecuencia de giro.



Figura 4: Anemómetro de conducto para medida del flujo de ventilación

3.4. Caracterización de la cama

3.4.1. Análisis físico-químico

Semanalmente se tomó una muestra compuesta de cada sala para el análisis de Nitrógeno Kjeldahl, pH, materia seca y cenizas. La muestra compuesta se obtuvo a partir de un muestreo representativo en 18 puntos, de acuerdo con Tasistro *et al.* (2004a). Para obtener estas muestras se recogieron 3 submuestras de cada zona central, entre comederos y bebederos, de los 6 pasillos de cada nave. La materia seca se obtuvo mediante secado en estufa a 104°C durante 24 horas.

3.4.2. Análisis microbiológico

Las muestras compuestas procedentes de la cama, debidamente identificadas y transportadas en una bolsa por cada sala (utilizada generalmente para la toma de muestras), fueron conservadas en frío (4°C) hasta su llegada al laboratorio de Microbiología que pertenece al departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València (UPV).

Para el recuento de microorganismos (viables aerobios mesófilos y enterobacterias) se utilizó la técnica de siembra en profundidad o en masa en sus respectivos medios de cultivo (Agar Plate Count y Violeta Rojo Bilis Glucosa). La composición de dichos medios la podemos encontrar en el anejo 2 y el método de siembra en el anejo 3.

Además durante el segundo ciclo también se realizó una siembra en superficie del medio de cultivo Salmonella Chromogenic agar base (cromógeno), medio selectivo y diferencial, cuya función es la de diferenciar el género *Salmonella* del resto de la familia de enterobacterias. Aquellas colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella*, se confirmaron mediante resiembras en triple estría en distintos medios de cultivo selectivos.

La lectura de los resultados se realizó a distintos tiempos dependiendo del organismo estudiado, teniéndose en cuenta aquellas placas cuyo número de colonias estaba comprendido entre 30 y 300 para bacterias. El número total de colonias contadas se multiplicó por el factor de dilución dando como resultado el recuento en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) según cada caso.

3.5. Concentraciones de material particulado

Para evaluar la técnica de volteo sobre el MP en suspensión, se utilizaron dos sistemas de registro: sistema de registro en continuo “Tapered Element Oscillating Microbalance” (TEOM) (**Figura 5**) y un sistema puntual gravimétrico con un impactador en cascada (RespiCon) (**Figura 6**).

3.5.1. Tapered element oscillating microbalance (TEOM)



Figura 5. Equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM)

El sistema continuo “Tapered element oscillating microbalance” (TEOM®, modelo 1405-D Thermo Fisher Scientific, EEUU) (**Figura 5**) es un monitor a tiempo real de masa de partículas que muestrea en continuo dos fracciones (PM10 Y PM2,5). Este sistema se utilizó para monitorizar en continuo la evolución durante el ciclo de producción, la concentración de dichas fracciones.

El monitor mide una masa mediante determinación de la frecuencia propia de vibración de un dispositivo de vidrio de forma tubular anclado en uno de sus extremos. Unos filtros retienen las partículas de la muestra de aire aspirada de modo continuo por el interior del elemento vibrante; al aumentar la cantidad de materia recogida en el filtro, aumenta la masa del elemento vibrante y aumenta progresivamente la frecuencia propia de vibración, de manera que la medida de esa frecuencia es una medida indirecta de la masa total depositada en el filtro. La concentración de partículas suspendidas en el aire se estima finalmente como el ratio entre la masa de partículas y el flujo de aire muestreado. Los filtros fueron cambiados cuando su carga superaba el 70%, para evitar problemas relacionados con exceso de partículas y absorción/desorción de humedad (Heber *et al.*, 2006).

Las muestras de MP se tomaron a 2 m de altura, en el interior de cada sala. En cada sala, el muestreo fue semanal, comenzando en la primera semana. El equipo se programó para registrar concentraciones cada minuto. El tiempo de muestreo fue de 24 horas por sala y semana, comenzando los días de tratamiento de volteo, trasladándose el equipo a otra sala al día siguiente.

3.5.2. Gravimetría: RespiCon



Figura 6. Bomba manual de succión e impactadores en cascada (RespiCon)

Se determinaron las concentraciones de tres fracciones de MP (PM2,5, PM10 y TSP) de forma puntual en cada sala, por el método gravimétrico, con un impactador virtual en cascada RespiCon® modelo 8522 (Helmunt Hunt GmbH, Wetzlar, Alemania)

(Figura 6). El impactador virtual consta de tres niveles en los que separa las partículas de acuerdo a los distintos tamaños. Se utilizó una bomba manual de succión (Buck Inc, EEUU) asociada al impactador para muestrear un caudal de 3,11 L/min. En el interior del impactador virtual, el flujo total de 3,11 L/min se divide en 3 caudales de 2,66, 0,33 y 0,11 L/min, para separar entre tamaños de partículas.

Las partículas se recogieron selectivamente en tres filtros de fibra de vidrio de 37 mm de diámetro (Dräger Safety Ag & Co., Luebeck, Alemania). Los filtros se estabilizaron a $20\pm 1^\circ\text{C}$ y $50\pm 5\%$ de humedad relativa durante 48 horas como mínimo antes de ser pesados. Éstos se pesaron en las mismas condiciones antes y después del muestreo, utilizando una balanza de 10 μg de precisión (Metler Toledo MX5, España) de acuerdo con la norma (EN 12341,1999).

La diferencia de masa coincide con el MP de cada fracción. La concentración de partículas en cada fracción (mg/m^3) se calcula en función de la masa de MP recogido y del volumen circulado a través del filtro. El cálculo se lleva a cabo a partir de las siguientes ecuaciones:

$$C_{PM2,5} = \frac{m_1 \times 1000}{Q_1 \times t}$$

$$C_{PM10} = \frac{(m_1 + m_2) \times 1000}{(Q_1 + Q_2) \times t}$$

$$C_{PM10} = \frac{(m_1 + m_2 + m_3) \times 1000}{(Q_1 + Q_2 + Q_3) \times t}$$

siendo:

C_{PMi} : Concentración de masa de las partículas de tamaño i (mg/m^3)

m_j : Masa de PM recogido de la fracción j (mg)

Q_j : Caudal en cada fracción j (L/min)

T : Duración del muestreo (min)

Los registros se realizaron semanalmente en una sala tratada con volteo y en una sala control simultáneamente. El impactador en cada sala se situó a 50 cm de la salida del ventilador, a una altura de 1,5 metros.

3.6. Concentraciones de microorganismos en aire

Se muestrearon las concentraciones de microorganismos en el aire en medio líquido usando un sistema de frascos borboteadores “impingers” (AGI-30, Ace Glass, EEUU) (**Figura 7**) que funcionan recogiendo un volumen de aire conocido en un medio de captación líquido. El medio de captación utilizado estaba compuesto de 20 mL de agua de peptona estéril, 0,01% de Tween y 0,005% de antiespumante. El muestreo se realizó por duplicado en cada sala (2 impingers/sala). El caudal de aire muestreado fue de 12,5 L/min para cada impinger, que se obtenía mediante una bomba de succión de caudal constante calibrada. El diámetro de corte de los borboteadores de aire fue de 0,3 μm , por tanto, se obtuvieron todos los microorganismos que superaban este diámetro.

El muestreo se llevó a cabo en cada sala en un punto próximo a la salida del aire, a 1,5 m de altura. Las muestras de aire se recogieron semanalmente en cada sala durante un tiempo de 15 minutos.

La solución líquida obtenida de cada impinger, debidamente identificada y transportada en un tubo falcon estéril por cada impinger (2 por sala) fue conservada en frío (4°C) hasta su llegada al laboratorio de Microbiología que pertenece al departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València (UPV).

Para el recuento de microorganismos en aire (viables aerobios mesófilos, enterobacterias y mohos y levaduras) se utilizó la técnica de siembra en profundidad o en masa en sus respectivos medios de cultivo (Agar Plate Count, Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa y Sabouraud con cloranfenicol). La composición de dichos medios la podemos encontrar en el anejo 2 y el método de siembra en el anejo 3.

La lectura de las placas se realizó tras la incubación, teniéndose en cuenta aquellas cuyo número de colonias estaba comprendido entre 30 y 300 para bacterias y 3 y 30 para mohos y levaduras. El cálculo de UFC/m³ se indica en el anejo 3.



Figura 7 Impingers situados en una sala

3.7. Concentraciones de gases

Las concentraciones de gases (NH_3 , CO_2 y N_2O) se midieron de forma casi-continua (cada 2 horas) desde el principio hasta el final del ciclo. Estas concentraciones se midieron mediante un medidor fotoacústico (Innova 1412, Lumasense, Dinamarca) (**Figura 8**).



Figura 8. Medidor fotoacústico para determinación de gases.

El fundamento de este medidor consiste en aplicar luz infrarroja intermitente de determinadas longitudes de onda preseleccionadas en función de los gases a medir. Cada tipo de molécula absorbe específicamente ciertas longitudes de onda, y esa absorción se transforma en un incremento de temperatura. Dado que la medición se realiza en una cámara cerrada, el incremento de temperatura va acompañado de un

incremento de presión que es captado gracias a una membrana que emite una señal acústica.

El sistema ofrece grandes ventajas, como la medición simultánea y precisa, y casi en continuo (medidas cada 30–100 segundos) de diversos gases. Sin embargo es muy sensible al vapor de agua y el polvo, siendo problemática la medición de CH₄ a bajas concentraciones.

Se ubicaron dos sondas de medición en la salida de extracción de aire de cada sala y dos sondas en el exterior para determinar las concentraciones de fondo.

3.8. Análisis de datos

3.8.1. Cálculo de emisiones

Las emisiones de los distintos contaminantes (E, expresado en mg/h por animal) se calcularon mediante balance de masa en el interior de las salas, como el producto del flujo de ventilación (V, m³/h) por la diferencia de concentraciones de entre la salida y la entrada de aire de cada sala (C_{salida} y C_{entrada}, mg/m³), y teniendo en cuenta el número de animales en cada sala (N), según la siguiente expresión general:

$$E = \frac{V \times (C_{salida} - C_{entrada})}{N}$$

En el caso del MP y microorganismos, se consideró que las cantidades de entrada eran despreciables frente a las de salida, siendo por tanto la emisión el resultado de multiplicar el flujo de ventilación por la concentración de salida.

3.8.2. Efecto del volteo

El efecto del volteo se estudió con un análisis de varianza considerando los datos semanales de los distintos parámetros analizados: parámetros ambientales, características de la cama, microorganismos en el aire, partículas y gases. Para ello se utilizó el siguiente modelo de medidas repetidas, considerando la semana como factor de repetición dentro de cada tratamiento y cada ciclo, utilizando el procedimiento MIXED de SAS:

$$X_{ijk} = \mu + T_i + S_j + T_i * S_j + C_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

X_{ijk}: Variable analizada

μ : Media

T_i : Tratamiento

S_j : Semana

C_k : Ciclo

ε_{ijk} : Error

A las variables con distribución asimétrica (recuentos y emisiones de microorganismos y concentraciones y emisiones de NH_3) se les aplicó una transformación logarítmica antes del análisis. En aquellos casos en los que el ciclo resultó significativo, el análisis estadístico fue repetido por ciclos separados, excluyendo la variable C_k del modelo anterior.

4. RESULTADOS

4.1. Parámetros ambientales

Los parámetros ambientales registrados durante el experimento se muestran en la **Tabla 1** para el ciclo 1, y en la

Tabla 2 para el ciclo 2.

En la **Tabla 1** se observa que en el ciclo 1 la temperatura en el interior de las salas disminuyó a lo largo de las semanas para ambos tratamientos, no se observaron diferencias entre tratamientos. En la humedad relativa ocurrió lo contrario, aumentó a lo largo de las semanas, con una ligera variación en la semana 6. El ambiente fue el parámetro más variable y la ventilación aumentó a lo largo del ciclo y fue similar tanto para tratamiento como para control.

En la

Tabla 2 se observan los parámetros ambientales del ciclo 2, dando valores similares a los del ciclo 1 con una mayor diferencia en el ambiente exterior.

Con el análisis estadístico, en todas las variables se obtuvo un efecto significativo de la semana, también se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la humedad relativa interior tanto en los dos ciclos juntos como separados ($p < 0,01$). Las diferencias entre tratamientos no fueron significativas ($p > 0,05$).

Tabla 1. Parámetros ambientales durante el ciclo 1 en el interior de las salas: temperatura interior (T int) y humedad relativa (HR int) y en el exterior (T ext y HR ext) y flujos de ventilación (V) en las salas control (C) y tratamiento con volteo (T)

Semana	T int (°C)		HR int (%)		Ambiente		V (m ³ /h·an)	
	C	T	C	T	T ext	HR ext	C	T
1	31,2	31,5	30,0	32,4	16,1	55,1	1,53	0,90
2	29,4	29,2	32,9	35,3	14,6	54,2	1,63	1,39
3	26,5	26,5	35,0	37,3	12,2	54,8	2,37	2,10
4	25,0	24,9	35,8	38,8	9,0	57,9	2,86	2,86
5	23,2	23,2	41,0	42,0	6,3	64,0	3,71	3,91
6	23,0	23,2	49,8	51,5	11,3	61,6	4,50	3,97
7	19,2	20,5	44,5	45,2	8,3	68,8	3,25	2,57

Tabla 2. Parámetros ambientales durante el ciclo 2 en el interior de las salas: temperatura interior (T int) y humedad relativa (HR int) y en el exterior (T ext y HR ext) y flujos de ventilación (V) en las salas control (C) y tratamiento con volteo (T)

Semana	T int (°C)		HR int (%)		Ambiente		V (m ³ /h-an)	
	C	T	C	T	Temp	HR	C	T
1	31,2	30,2	32,4	32,6	8,6	71,5	0,59	0,87
2	30,1	27,7	33,0	33,4	3,6	54,7	0,68	1,09
3	27,8	27,5	39,0	37,5	6,1	67,9	1,11	1,61
4	24,8	25,3	41,4	40,9	8,0	57,4	2,12	2,42
5	22,5	23,0	47,8	49,6	8,6	65,1	3,09	3,18
6	22,0	22,3	51,3	52,7	12,0	53,8	3,64	3,22
7	17,1	16,5	53,2	49,9	11,1	51,2	5,07	4,08

4.2. Caracterización de la cama

4.2.1. Parámetros físico-químicos

La evolución de las principales características físico-químicas de la cama durante el experimento se muestra en la **Tabla 3** para el ciclo 1 y en la **Tabla 4** para el ciclo 2.

Se puede observar que el contenido en materia seca disminuyó a lo largo de cada ciclo, mientras que el contenido en cenizas se incrementó, al igual que el contenido en nitrógeno y el pH.

Al igual que con las condiciones ambientales, en todos los casos se obtuvo un efecto significativo de la semana ($P < 0,01$) y el efecto tratamiento no fue significativo ($P > 0,05$). Sin embargo, en este caso el ciclo también fue significativo en el caso de la materia seca, cenizas y Nitrógeno Kjeldhal ($P < 0,05$). En los ciclos separados estos parámetros analizados fueron significativos entre semanas ($P < 0,01$).

Tabla 3. Características físico-químicas de la cama para el ciclo 1: materia seca (MS), cenizas (Cen), Nitrógeno Kjeldahl (N) y pH.

Semana	MS (%)		Cen (% MS)		N (% MS)		pH	
	C	T	C	T	C	T	C	T
1	93,6	93,4	0,74	0,65	0,13	0,12	5,68	5,48
2	93,4	93,4	1,38	1,07	0,36	0,39	6,12	6,10
3	93,3	92,0	1,54	1,98	0,47	0,59	6,37	5,40
4	90,4	87,5	3,15	3,94	0,97	1,29	6,54	6,49
5	86,3	81,8	5,15	6,48	1,77	2,16	6,66	7,20
6	82,8	81,2	6,64	7,37	2,33	2,62	6,92	7,82
7	83,2	80,6	8,51	9,23	3,10	2,80	7,94	8,64

Tabla 4. Características físico-químicas de la cama para el ciclo 2: materia seca (MS), cenizas (Cen), Nitrógeno Kjeldahl (N) y pH.

Semana	MS (%)		Cen (% MS)		N (% MS)		pH	
	C	T	C	T	C	T	C	T
1	93,6	93,1	0,42	3,75	0,18	0,26	5,11	5,43
2	93,5	92,5	0,84	3,24	0,34	0,40	5,55	5,64
3	90,4	90,3	3,21	4,52	1,23	1,12	6,07	6,04
4	83,2	86,2	6,75	5,69	2,59	1,69	6,64	6,27
5	81,8	79,6	7,36	8,03	2,87	2,78	7,19	7,14
6	75,6	78,0	9,96	9,57	3,57	3,16	8,42	8,47
7	72,4	75,3	12,97	11,62	4,06	3,40	8,61	8,62

4.2.2. Recuentos de viables aerobios mesófilos en cama

La **Figura 9** muestra la evolución de los microorganismos aerobios mesófilos (AM) obtenida de las muestras de cama a lo largo de los dos ciclos para la media de las salas tratamiento y la sala control.

El ciclo 1 la presencia de microorganismos aerobios mesófilos aumentó de forma continua desde $3,0 \times 10^7$ UFC/g en la sala control de la semana 3 hasta $7,8 \times 10^{10}$ UFC/g en la semana 7. El tratamiento presentó un mayor número de AM que el control, en un orden de magnitud más o dentro del mismo orden, exceptuando en la semana 5 que ocurrió lo contrario, la sala control presentó un orden mayor de microorganismos en cama que la media de las salas tratamiento.

El segundo ciclo presentó un aumento continuo del número de UFC con un orden de magnitud superior de AM en la semana 3 que el ciclo 1 ($2,5 \times 10^8$ UFC/g) en la sala tratamiento, hasta alcanzar $4,7 \times 10^9$ UFC/g en la semana 6. En la semana 3 y 4

en la sala control la cantidad de microbiota era ligeramente mayor, dentro del mismo orden de magnitud, que en el tratamiento, posteriormente ocurrió lo inverso, superando la carga microbiana del tratamiento a la del control en un orden de magnitud.

La mayor diferencia entre los dos ciclos es la disminución de la cantidad de AM en la última semana, ya que en el ciclo 2 esta disminuye, manteniéndose por encima el tratamiento, mientras que en el ciclo 1 seguía aumentando.

Según el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P > 0,05$), aunque el efecto semana resultó ser significativo ($P < 0,01$).

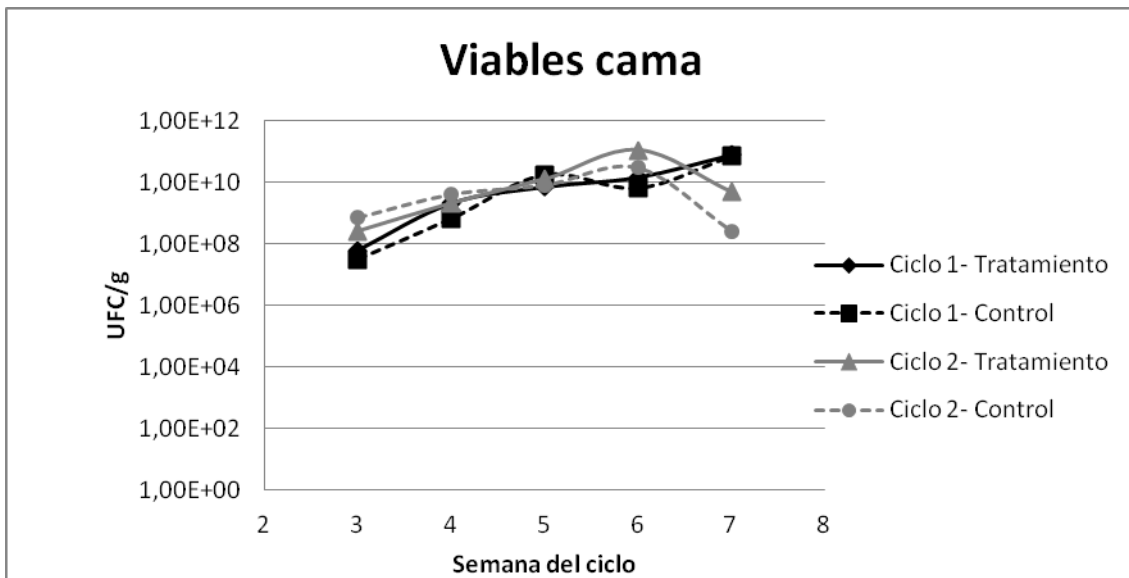


Figura 9. Lectura de microorganismos aerobios mesófilos de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control

En la **Figura 10** se puede observar el crecimiento de las colonias de microorganismos aerobios mesófilos tras su incubación



Figura 10. Placa Petri conteniendo colonias de microorganismos aerobios mesófilos en medio de cultivo PCA tras 48 horas de incubación.

4.2.3. Recuentos de Enterobacterias en cama

La **Figura 11** muestra el número de enterobacterias procedente de las muestras de cama obtenidas a lo largo de los dos ciclos para la media de las salas tratamiento y la sala control.

En ambos ciclos el comportamiento de las enterobacterias fue similar, aunque con diferencias entre las salas de tratamiento y la sala control.

En el ciclo 1 las enterobacterias se obtuvieron desde el valor $1,9 \times 10^4$ UFC/g en la semana 3 del control hasta alcanzar el valor $8,3 \times 10^7$ UFC/g en la semana 6 del control. La diferencia entre tratamiento y control estuvo entre 0 y 2 órdenes de magnitud durante todo el ciclo, siendo superior el tratamiento en todas las semanas excepto en la semana 6 que ocurrió lo inverso, el número de enterobacterias fue superior en el control que en el tratamiento (dentro del mismo orden). De la semana 4 a la 5 y de la semana 6 a la 7 hubo una disminución del número de enterobacterias en la sala control, de la semana 5 a la 6 también hubo un descenso pero en este caso en el tratamiento, todos los descensos fueron entorno a un orden de magnitud.

En el segundo ciclo en la semana 3, tratamiento y control tuvieron una carga microbiana similar ($\sim 2 \times 10^6$ UFC/g) hasta alcanzar el máximo valor en la semana 5 la sala tratamiento ($1,3 \times 10^9$ UFC/g). El mayor descenso se presentó en el tratamiento de la semana 5 a la 6 en 2 órdenes de magnitud. La diferencia entre tratamiento y control varió durante el ciclo entre 0 a 1 orden de magnitud, en las semanas 4 y 5 el número de enterobacterias en el tratamiento fue superior al del control, mientras que en las semanas restantes ocurrió lo inverso, el control tuvo mayor carga microbiana que el tratamiento.

Estadísticamente, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P > 0,05$), aunque el efecto semana resultó ser significativo ($P < 0,01$).

Además, en el segundo ciclo se investigó la presencia de *Salmonella spp.*, no detectándose en ningún caso.

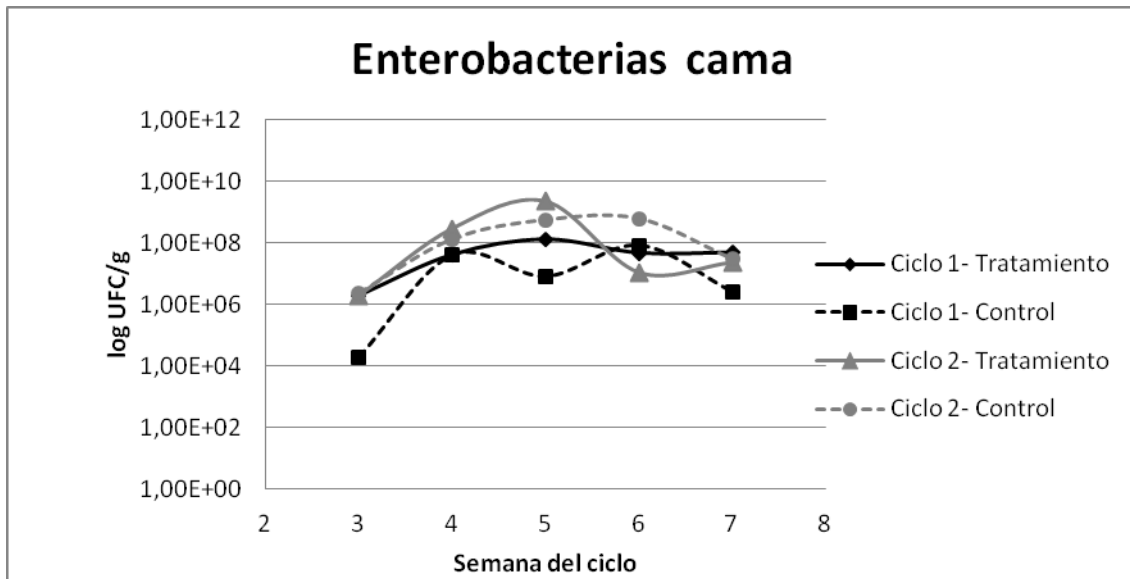


Figura 11. Lectura de enterobacterias procedentes de las muestras de cama durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.

En la **Figura 12** se puede observar el crecimiento de las colonias típicas de enterobacterias tras su incubación.



Figura 12. Placa Petri conteniendo colonias de enterobacterias en medio de cultivo VRBG tras 24 horas de incubación.

4.3. Material particulado

4.3.1. Concentraciones de material particulado

Como se aprecia en la **Tabla 5** a lo largo del ciclo 1 hubo un cambio en la concentración de las distintas fracciones de MP (PM_{2,5}, PM₁₀ y TSP) con un aumento de la concentración puntual medida en la semana tres hasta la quinta semana, alcanzando los valores más altos de MP durante ésta última (6,00 mg/m³ TSP; 2,96 mg/m³ PM₁₀; 0,43 mg/m³ PM_{2,5} en la sala tratamiento) y decreciendo en la última semana.

Las concentraciones de MP, como se observa en la **Tabla 5**, fueron mayores en la sala tratamiento que en la control a lo largo del ciclo 1, excepto en la fracción PM_{2,5} en la tercera semana, que ocurrió lo contrario. Se alcanzaron mayores concentraciones de media en el tratamiento para las 3 fracciones (PM_{2,5}, PM₁₀ y TSP), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (P>0,05).

En el ciclo 2 no se obtuvieron datos de MP debido a la avería del equipo de medición de partículas por gravimetría (Respicon).

Tabla 5. Concentraciones de PM_{2,5}, PM₁₀ y TSP (mg/m³) en momentos puntuales del ciclo 1 (semana 3 a al 6) para las salas tratamiento y la sala control.

Semana	Tratamiento	PM _{2,5}	PM ₁₀	TSP
3	Tratamiento	0,13	1,60	3,60
	Control	0,14	1,24	3,20
4	Tratamiento	0,29	2,08	4,44
	Control	0,10	1,26	3,90
5	Tratamiento	0,43	2,96	6,00
	Control	0,21	2,08	4,61
6	Tratamiento	0,26	1,54	3,39
	Control	0,24	1,51	3,26
Media	Tratamiento	0,28	2,05	4,36
	Control	0,17	1,53	3,75

En la **Figura 13** y **Figura 14** se observa la evolución de la concentración de MP a lo largo del ciclo 1 y del ciclo 2 para las salas tratamiento y la sala control y los momentos de volteo de la cama. En el ciclo 1 (**Figura 13**) durante los días de volteo (18,19, 25, 26, 32 y 33) se observan los mayores picos de concentración, alcanzando el valor más alto (>16 mg/m³) al día 19. En el ciclo 2 estos picos se obtuvieron en los

días (18,19, 25, 26, 32, 33, 39 y 40), pero en concentraciones menores, alcanzando el valor más alto el día 32 (**Figura 14**).

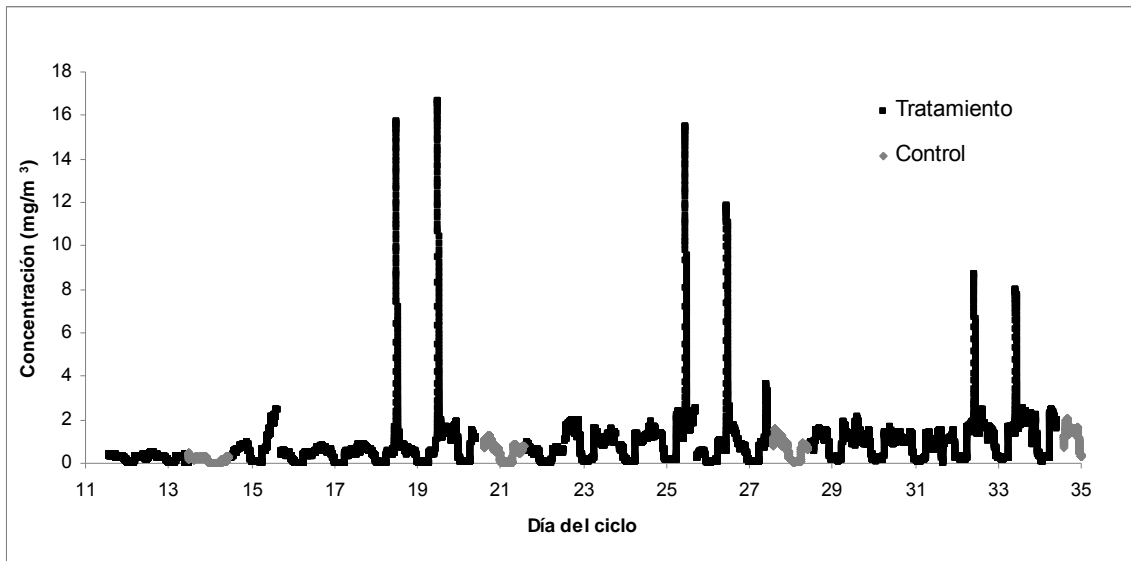


Figura 13. Evolución a lo largo del ciclo 1 (días 11 al 35) de la concentración diaria de PM10 (mg/m^3) para las salas tratamiento y la sala control y los momentos de volteo de la cama obtenida mediante el TEOM

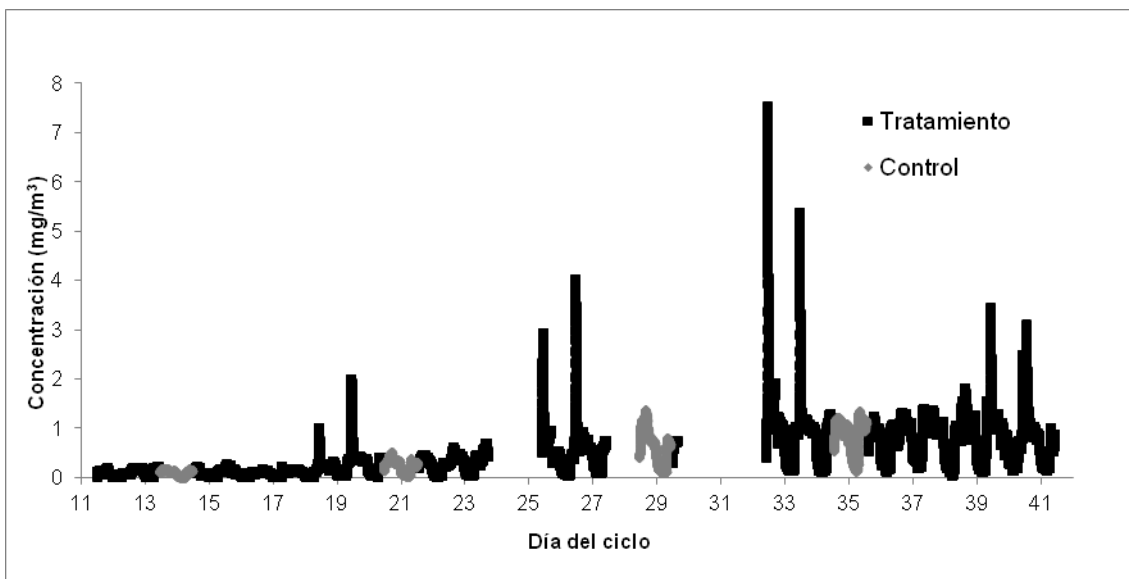


Figura 14. Evolución a lo largo del ciclo 2 (días 11 al 42) de la concentración diaria de PM10 (mg/m^3) para las salas tratamiento y la sala control y los momentos de volteo de la cama obtenida mediante el TEOM.

4.3.2. Emisiones de material particulado

Como se aprecia en la **Tabla 6** a lo largo del ciclo 1 hubo una variación de la concentración de las distintas fracciones de MP (PM_{2,5}, PM₁₀ y TSP) con un aumento de la concentración puntual medida en la semana 3 hasta la semana 5, alcanzando los valores más altos de MP durante ésta última (566,8 mg/día/animal TSP; 281,7 mg/día/animal PM₁₀; 41,7 mg/día/animal PM_{2,5} en la sala tratamiento) y, al contrario que las concentraciones de MP, decreciendo en la última semana en la sala tratamiento y aumentando en la control.

Las emisiones de MP, como se observa en la **Tabla 6**, fueron mayores en la sala tratamiento que en la control, excepto en la semana 3 y la 6, en las cuales la sala control tiene mayores emisiones en las 3 fracciones. Se alcanzaron mayores emisiones de media en el tratamiento para las fracciones PM_{2,5} y PM₁₀, pero en la fracción TSP fueron ligeramente mayores en el control.

Al igual que en las concentraciones, la estadística se realizó únicamente en el ciclo 1 y para todas las variables estudiadas, las diferencias fueron no significativas entre tratamientos ($P > 0,05$).

Tabla 6. Emisiones de MP por día y animal (mg/día/animal) en momentos puntuales del ciclo 1 (semana 3 a la 6) para las salas tratamiento y la sala control

Semana	Tratamiento	PM _{2,5}	PM ₁₀	TSP
3	Tratamiento	5,1	66,3	154,1
	Control	9,7	86,3	223,7
4	Tratamiento	21,6	154,8	330,8
	Control	6,9	86,2	265,3
5	Tratamiento	41,7	281,7	566,8
	Control	17,5	175,4	389,2
6	Tratamiento	22,6	139,4	325,0
	Control	36,7	229,9	519,2
Media	Tratamiento	22,8	160,6	344,2
	Control	17,7	144,4	349,4

4.4. Microorganismos

4.4.1. Recuentos de viables aerobios mesófilos en aire

La **Figura 15** muestra la evolución de la cantidad de AM obtenida utilizando la técnica de borboteadores a lo largo de los dos ciclos para la media de las salas tratamiento y la sala control.

El ciclo 1 la presencia de AM aumentó de forma continua desde $1,4 \times 10^4$ UFC/m³ en la sala control de la semana 3 hasta $7,6 \times 10^7$ UFC/m³ en el tratamiento de la semana 7. La cantidad de microbiota suspendida en el aire fue menor que la leída en la cama, siendo éstas emisiones 3 órdenes de magnitud menores. Tratamiento y control tuvieron valores similares, dentro del mismo orden, hasta la última semana, siendo mayor la cantidad de AM en el tratamiento que en el control, como ocurrió también con el número de AM en cama **Figura 9**. En este caso en la última semana la diferencia fue de un orden de magnitud y en la semana 5 el control no fue mayor que el tratamiento (**Figura 15**). En el ciclo 2, la cuantificación de AM en aire fue menor que en la cama, con 5 ordenes menos ($4,5 \times 10^3$ UFC/g) en la sala control, hasta alcanzar $1,6 \times 10^7$ UFC/m³ en la semana 7 (2 ordenes menos que los AM encontrados en la cama). La diferencia entre tratamiento y control fue ligera, siendo el tratamiento mayor que control, dentro del mismo orden, excepto en la cuarta semana, en la cual el control es mayor que el tratamiento, tal como ocurría en las semanas 3 y 4 en la cama pero en este caso la diferencia fue de un orden de magnitud.

Una ligera diferencia entre los dos ciclos fue la cantidad de AM en la semana 3, un orden de magnitud mayor en el ciclo 1, además el tratamiento del ciclo 1 en las semanas 4 y 5 presentaba un orden más que el ciclo 2 y en la semana 6 sucedía lo opuesto, el ciclo 1 presentaba un orden menos que el ciclo 2.

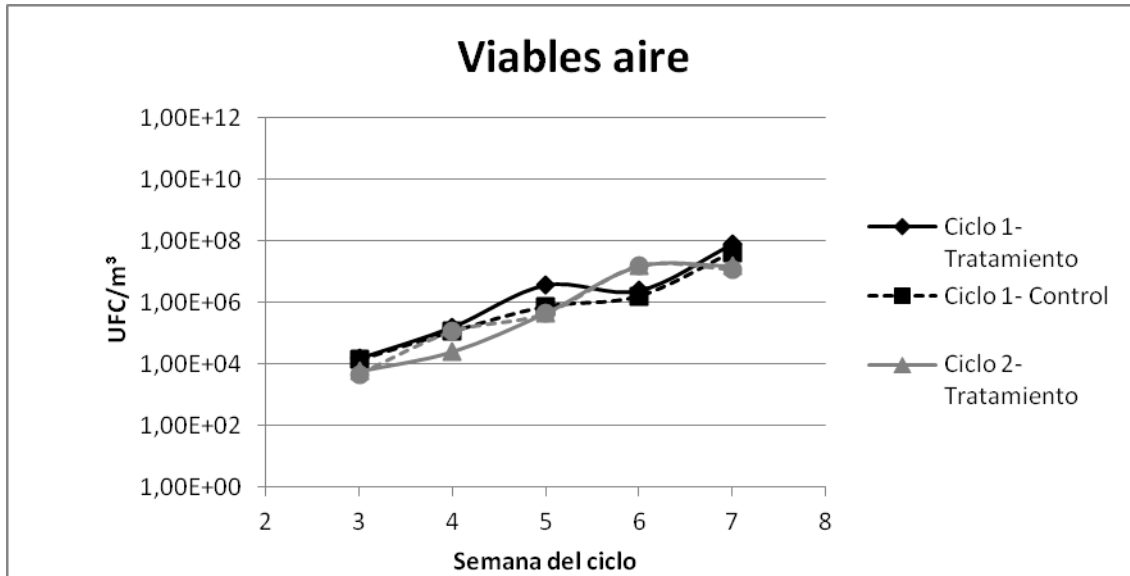


Figura 15. Lectura de microorganismos aerobios mesófilos de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control

Al igual que en los viabiles AM en cama, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P > 0,05$), aunque el efecto semana resultó ser significativo ($P < 0,01$).

4.4.2. Viabiles aerobios mesófilos: emisiones

La **Figura 16** muestra la evolución de AM obtenida a partir de la cantidad, ventilación y número de animales a lo largo de los dos ciclos para la media de las salas tratamiento y la sala control.

La **Figura 16** es similar a la gráfica de cuantificación de AM en el aire (**Figura 15**). En el ciclo 1 hubo una diferencia ligera en el control de la semana 5, donde la emisión de AM fue un orden de magnitud mayor ($2,0 \times 10^6$ UFC/h/animal) que la cantidad de AM en aire ($7,5 \times 10^5$ UFC/m³) y en la última semana ocurrió lo contrario, la cantidad de AM en aire presentó un orden menos que las emisiones ($7,6 \times 10^7$ UFC/m³ / $3,5 \times 10^8$ UFC/h/animal, respectivamente). En el segundo ciclo no se obtuvieron datos de ventilación para todas las semanas, por tanto se obtuvieron únicamente las emisiones de las semanas 4, 6 y 7. Durante el ciclo 2 no se encontraron diferencias entre emisiones y cantidad de AM.

Del mismo modo que en los viabiles AM en aire, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P > 0,05$), aunque el efecto semana resultó ser significativo ($P < 0,01$).

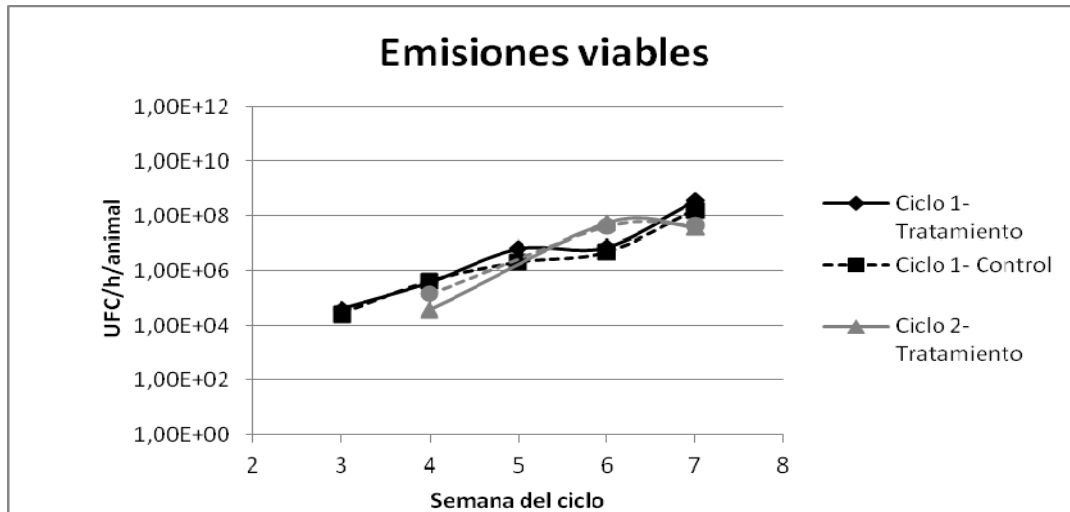


Figura 16. Lectura de microorganismos aerobios mesófilos de la muestra obtenida a partir de la cuantificación de AM, ventilación y número de animales de la nave experimental durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control

4.4.3. Recuentos de mohos y levaduras en aire

La **Figura 17** muestra la evolución de los mohos y levaduras obtenidos utilizando la técnica de borbobedores de aire a lo largo de los dos ciclos para la media de las salas tratamiento y la sala control.

Como se aprecia en la (**Figura 17**) el ciclo 1 presentó un incremento de mohos y levaduras desde $2,1 \times 10^2$ UFC/m³ en la sala control de la semana 3 hasta alcanzar el máximo valor ($1,2 \times 10^6$ UFC/m³) en la semana 7. En todas las semanas el tratamiento contenía un mayor número de mohos y levaduras que la sala control (dentro del mismo orden o con una diferencia de un orden), excepto en la última semana que ocurrió lo contrario pero con un orden de diferencia. También se observó una disminución, dentro del mismo orden de magnitud, en el tratamiento de la semana 5 a la semana 6, tal como ocurría con los AM (**Figura 15**). El ciclo 2 presentó un aumento del número de mohos y levaduras desde $2,0 \times 10^2$ UFC/m³ en la sala control de la semana 3 hasta llegar a $2,4 \times 10^6$ log UFC/m³ en el tratamiento de la semana 7. En este ciclo, al contrario que el ciclo 1 en la semana 3, 4 y 5 el control presentó mayor cantidad de mohos y levaduras que el tratamiento, con una diferencia de 2 órdenes de magnitud en la semana 4 y en las dos últimas semanas ocurrió lo inverso, con una diferencia de 2 órdenes en la semana 7.

Mediante el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P>0,05$), aunque el efecto semana resultó ser significativo ($P<0,01$).

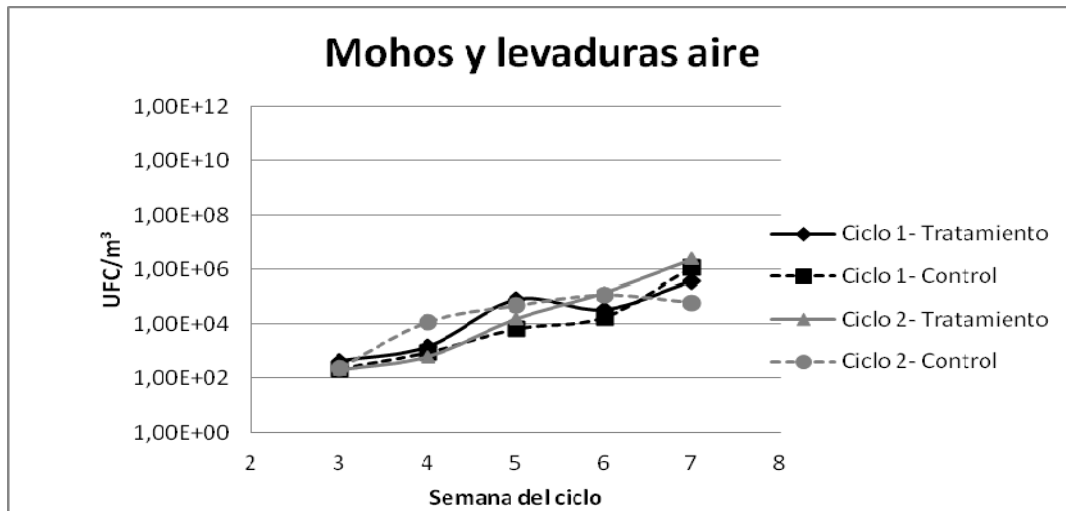


Figura 17. Lectura de mohos y levaduras de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control

En la **Figura 18** se puede observar el crecimiento de las colonias típicas de mohos y levaduras tras su incubación.

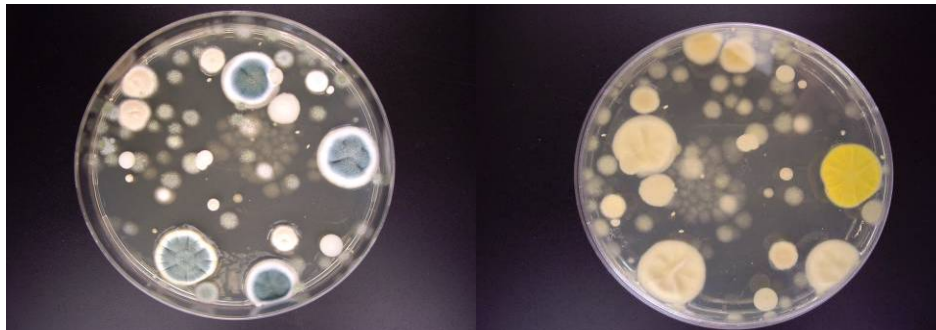


Figura 18. Placa Petri conteniendo colonias de mohos y levaduras en medio de cultivo SB a las 24 horas de incubación

4.4.4. Mohos y levaduras en aire: emisiones

La **Figura 19** muestra la evolución de las emisiones de los mohos y levaduras obtenida a partir de los resultados anteriores, la ventilación y los animales de la nave experimental a lo largo de los dos ciclos para la media de las salas tratamiento y la sala control.

En el ciclo 1 la evolución es similar a la representada para la cantidad de mohos y levaduras en aire, ya que ambos comenzaron en la semana 3 y terminaron en la semana 7 con el mismo orden de magnitud. La diferencia se encuentra en el control de la semana 4, en el tratamiento y control de la semana 5 y en el tratamiento de la semana 7, ya que en las emisiones fueron de 1 orden mayor que la cuantificación de mohos y levaduras (**Figura 17**). En el segundo ciclo no se obtuvieron datos de ventilación de todas las semanas, por lo tanto, únicamente se obtuvieron las emisiones de las semanas 4, 6 y 7 como se aprecia en la **Figura 19**. Solamente hubo una diferencia en el control de la semana 7, que fue de un orden mayor en las emisiones que en la cuantificación.

De igual modo que en aire, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P>0,05$), aunque el efecto semana resultó ser significativo ($P<0,01$).

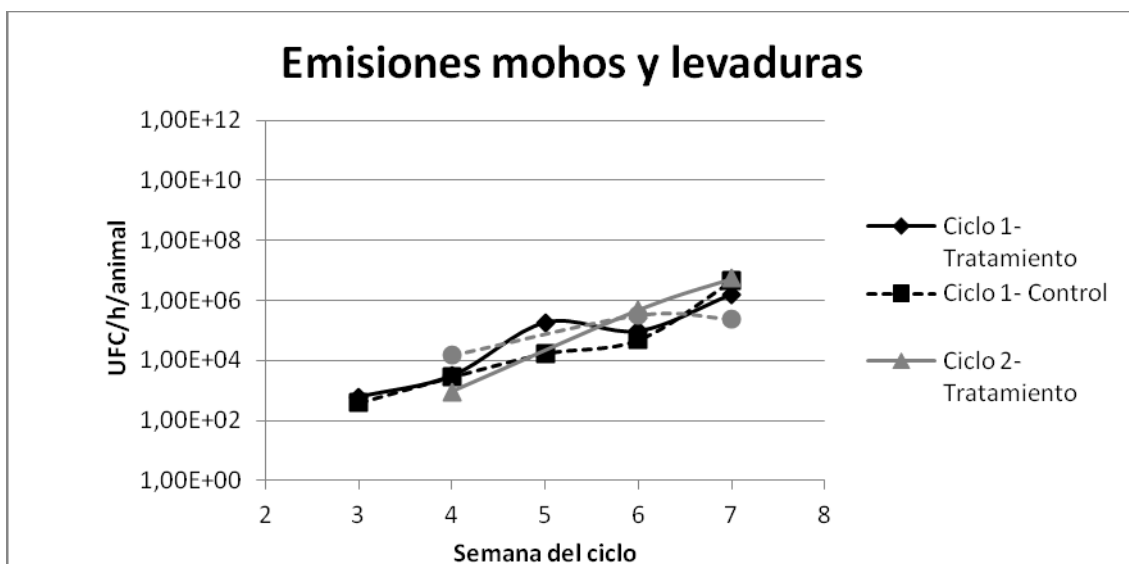


Figura 19. Lectura de mohos y levaduras de la muestra obtenida a partir de la cuantificación de hongos y levaduras, ventilación y número de animales de la nave experimental durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.

4.4.5. Recuentos de enterobacterias en aire

La **Tabla 7** muestra la evolución del número de enterobacterias obtenidas utilizando la técnica de borbatedores de aire a lo largo de los dos ciclos para la media de las salas tratamiento y la sala control.

Durante ambos ciclos hay grandes diferencias, ya que la presencia de enterobacterias en aire solo se observa en algunas semanas y no en todas las salas.

En el primer ciclo la **Tabla 7** muestra la lectura de enterobacterias con presencia en el tratamiento en la semana 5 con un valor de $1,5 \times 10^2$ UFC/m³ y en la semana 7 ($9,3 \times 10^1$), y en la sala control en la semana 7 ($1,3 \times 10^2$ UFC/m³). En el segundo ciclo varía la lectura de enterobacterias, mostrando su presencia durante la semana 4, 5, 6 en el tratamiento. En la semana 4 ($2,7 \times 10^1$ UFC/m³), semana 5 ($2,6 \times 10^2$ UFC/m³), y finalmente en la semana 6 ($1,1 \times 10^2$ UFC/m³) en la sala control y $1,33 \times 10^2$ UFC/m³ en el tratamiento.

Se encontró una gran diferencia de enterobacterias encontradas en aire con las encontradas en la cama, de hasta 7 órdenes. Mientras que en el aire la presencia fue puntual durante ambos ciclos, en la cama hubo una alta cantidad de enterobacterias de forma continua.

Usando la estadística, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos, tratamientos, ni semanas ($P > 0,05$).

Tabla 7. Lectura de enterobacterias (UFC/m³) de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire durante el ciclo 1 y 2, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control.

Semana	Tratamiento	Ciclo 1	Ciclo 2
3	Tratamiento	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	Control	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
4	Tratamiento	$<1,0 \times 10^1$	$2,7 \times 10^1$
	Control	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
5	Tratamiento	$1,5 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$
	Control	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
6	Tratamiento	$<1,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^2$
	Control	$<1,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^2$
7	Tratamiento	$9,3 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	Control	$1,3 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$

4.4.6. Enterobacterias en aire: emisiones

La **Tabla 8** muestra la evolución de las emisiones de enterobacterias obtenida a partir de los resultados anteriores, la ventilación y los animales de la nave experimental a lo largo de los dos ciclos para la media de las salas tratamiento y la sala control.

En el ciclo 1 la presencia de enterobacterias fue similar a la representada para la cantidad en aire, también se emitieron enterobacterias al aire en el tratamiento de la semana 5 y 7 y en el control de la semana 7. En el segundo ciclo no se obtuvieron datos de la ventilación todas las semanas, por tanto se obtuvieron únicamente las emisiones de las semanas 4, 6 y 7, con presencia en el tratamiento de la semana 4 y en el tratamiento y control de la semana 6.

De forma estadística, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P>0,05$), aunque a diferencia de la cantidad de enterobacterias en aire, el efecto semana resultó ser significativo ($P<0,01$).

Tabla 8. Lectura de enterobacterias (UFC/h por animal) de la muestra obtenida a partir de la cuantificación de enterobacterias, ventilación y número de animales de la nave experimental durante el segundo ciclo, diferenciando la media de las dos salas tratamiento de la sala control

Semana	Tratamiento	Ciclo 1	Ciclo 2
3	Tratamiento	$<1,0 \times 10^1$	-
	Control	$<1,0 \times 10^1$	-
4	Tratamiento	$<1,0 \times 10^1$	$3,7 \times 10^1$
	Control	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
5	Tratamiento	$2,4 \times 10^2$	-
	Control	$<1,0 \times 10^1$	-
6	Tratamiento	$<1,0 \times 10^1$	$4,6 \times 10^2$
	Control	$<1,0 \times 10^1$	$2,8 \times 10^2$
7	Tratamiento	$3,8 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$
	Control	$5,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$

4.5. Gases

4.5.1. Concentración de NH_3

La evolución de concentración de NH_3 diario durante los dos ciclos se observa en la **Figura 20**, donde los valores se mantuvieron cerca de 0 mg/m^3 hasta el día 28. Posteriormente se incrementó la concentración en ambos ciclos hasta alcanzar el máximo valor ($>20 \text{ mg/m}^3$) en el volteo del ciclo 2.

Como vemos también en la **Figura 20** solamente se observaron diferencias entre las salas tratamiento y control a final del primer ciclo, a partir del día 28. En el ciclo 1 la diferencia entre tratamiento y control fue más acusada que en el ciclo 2,

registrándose de forma sistemática hasta el final del ciclo. En el ciclo 2 la concentración de NH_3 fue mayor en la sala control que en la tratamiento a partir del día 28 hasta el día 32, donde ocurrió lo inverso hasta el día 42. Se apreciaron las mayores concentraciones de NH_3 en el segundo ciclo a partir del día 28 con una diferencia con el primero de casi 10 mg/m^3 durante la última semana.

Con el uso de la estadística, no se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P>0,05$), aunque el efecto semana resultó ser significativo ($P<0,01$).

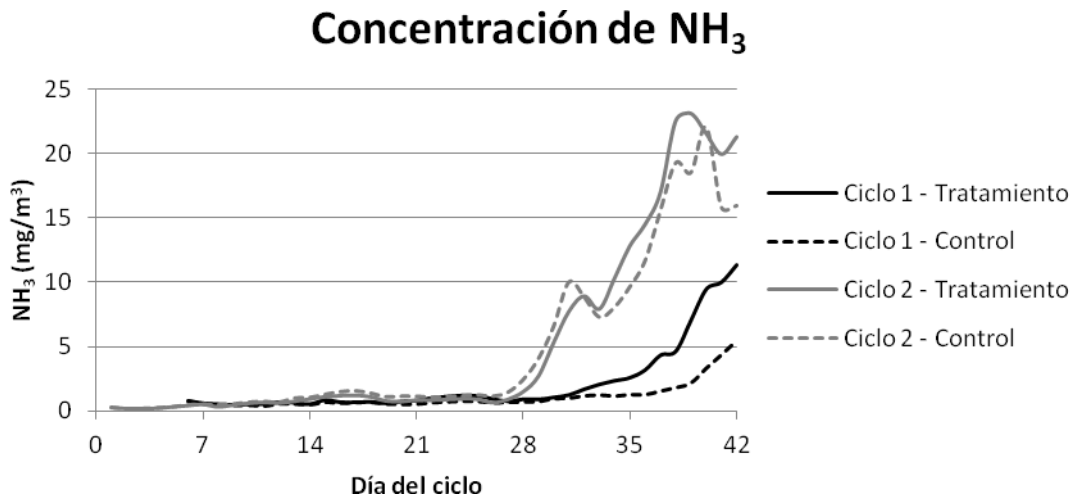


Figura 20. Concentración media diaria de NH_3 (mg/m^3) durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento

4.5.2. Emisión de NH_3

La evolución de emisión de NH_3 diario durante los dos ciclos se observa en la **Figura 21**, donde la pauta obtenida fue similar a la de las concentraciones de este gas (**Figura 20**). Al igual que las concentraciones, las emisiones también se mantuvieron cerca de 0 mg/h por animal hasta el día 28. A partir de este momento se incrementó la emisión en ambos ciclos hasta alcanzar un valor aproximado de 70 mg/h por animal al final del ciclo 2. Se apreciaron las mayores concentraciones de NH_3 en el segundo ciclo a partir del día 28, con una diferencia entre el primero de aproximadamente 20 mg/h por animal hasta la última semana.

A diferencia que en la concentración de NH_3 , se encontraron diferencias significativas en la emisión de este gas entre los dos ciclos ($p<0,05$) y entre semanas ($P<0,01$), sin embargo el efecto tratamiento no fue significativo ($p>0,05$). Analizando

los dos ciclos por separado, en ambos ciclos hubo diferencias significativas entre semanas ($P < 0,01$).

En la **Figura 21** también se muestran las diferencias entre la sala control y las salas tratamiento, especialmente a final del ciclo 1. No obstante, en el ciclo 2 las diferencias de emisión fueron menos evidentes.

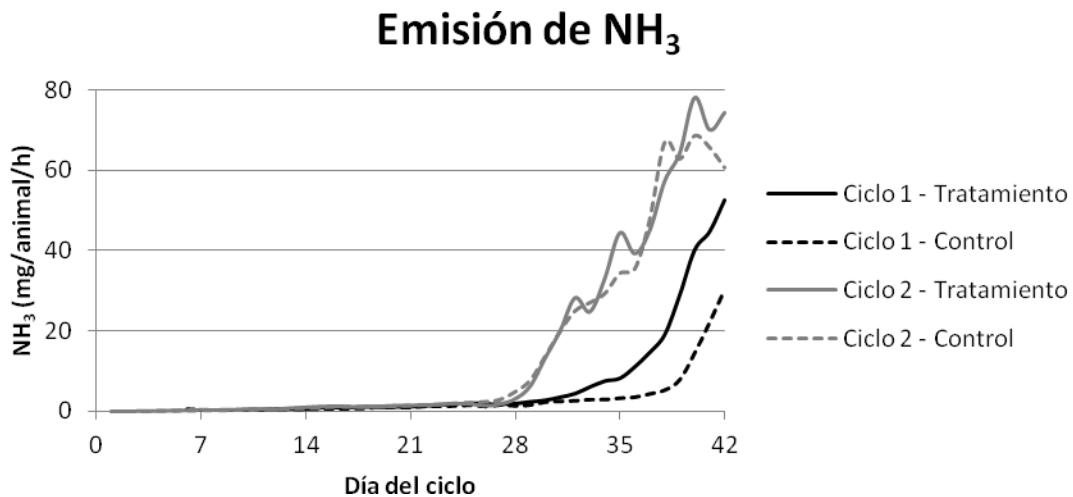


Figura 21. Emisión de NH_3 diario en mg/animal/h durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento

4.5.3. Concentración de CO_2

La evolución de concentración de CO_2 diario durante los dos ciclos se observa en la **Figura 22**. Se aprecia que el ciclo 2 presentó valores más altos que el ciclo 1 en la mayor parte del tiempo, alcanzando más de 5000 mg/m^3 de la primera a la tercera semana del ciclo (21 días), después los valores de ambos ciclos se mantienen por debajo de 4000 mg/m^3 hasta alcanzar cerca de 2500 mg/m^3 en la última semana.

En el ciclo 1 hubo una ligera diferencia entre tratamiento y control, con concentraciones mayores en el tratamiento que en el control, sobretodo hasta el día 30. En el ciclo 2 ésta diferencia entre tratamientos fue mayor, y ocurrió lo contrario, se obtuvieron menores concentraciones de CO_2 en el control que en el tratamiento hasta el día 21, después tratamiento y control se igualaron.

Con el uso de la estadística, se encontraron diferencias significativas entre los dos ciclos y entre semanas ($P < 0,05$), aunque el efecto tratamiento no fue significativo ($P > 0,05$). Analizando los dos ciclos por separado, en el ciclo 2 se encontró una diferencia significativa entre semanas ($P < 0,05$) que no se encontró en el ciclo 1.

En la **Figura 22** también se muestra la diferencia entre la sala control y las salas tratamiento, siendo las concentraciones mayores en las salas tratamiento que la sala control durante la primera mitad del segundo ciclo. A final del ciclo, sin embargo, tratamientos y controles se comportaron de forma similar.

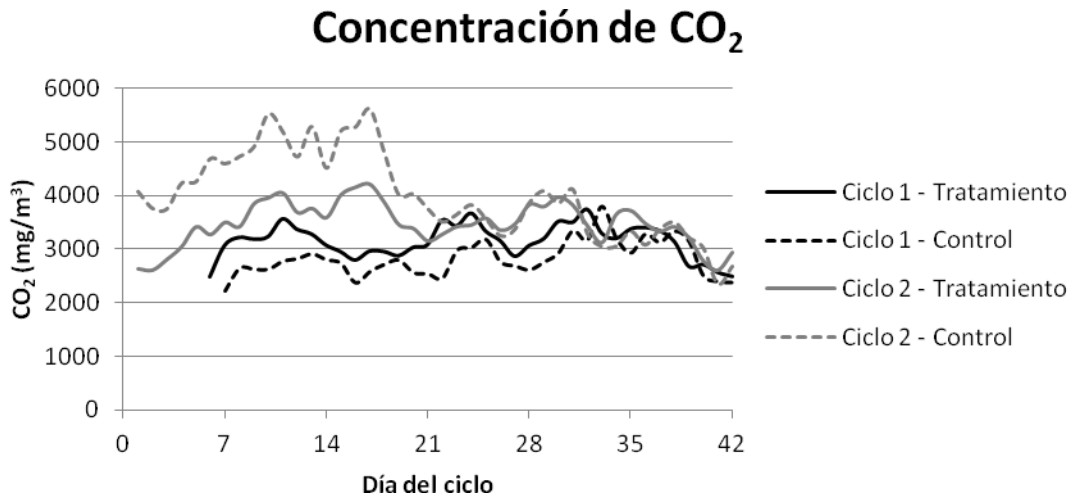


Figura 22. Concentración del gas CO₂ diario en mg/m³ durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento

4.5.4. Emisión de CO₂

La evolución de emisión de CO₂ diario durante los dos ciclos se observa en la **Figura 23**. Ésta es muy diferente a la evolución de la concentración de dicho gas, puesto que comienza con valores bajos (<2000 mg/animal/h) y aumenta a lo largo de ambos ciclos hasta superar los 10.000 mg/animal/h en la última semana. No se apreciaron diferencias de emisión entre ambos ciclos, y tampoco entre tratamiento y control.

A diferencia de la concentración, no se encontraron diferencias significativas en la emisión entre los dos ciclos ni entre tratamientos ($P > 0,05$), aunque el efecto semana fue significativo ($P < 0,01$).

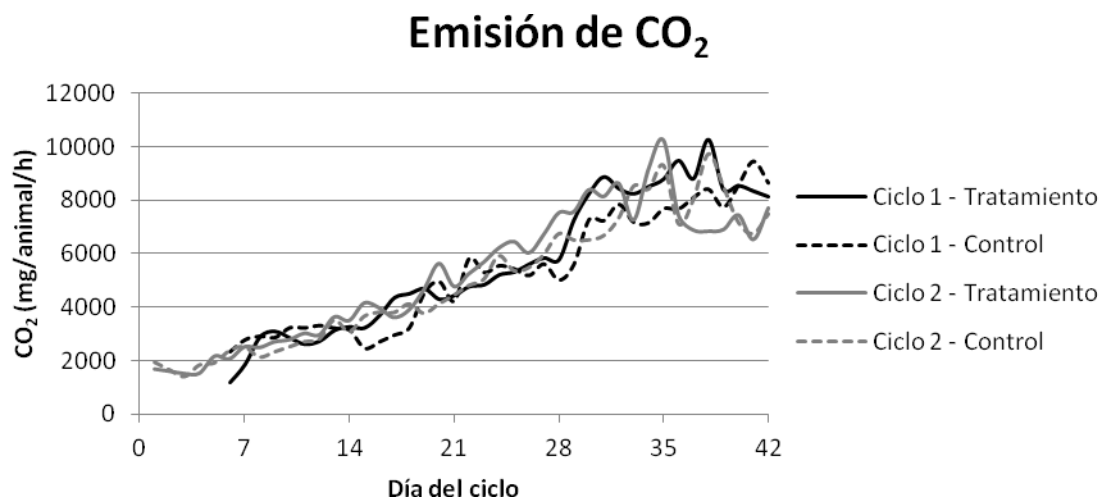


Figura 23. Emisión del gas CO₂ diario en mg/animal/h durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento

4.5.5. Concentración de N₂O

Las concentraciones de N₂O fueron bajas a lo largo de ambos ciclos. La evolución de concentración de N₂O diario durante los dos ciclos se observa en la **Figura 24**, donde los valores se mantuvieron en el rango de 0,5 a 1 mg/m³, excepto por pequeños incrementos puntuales. La primera mitad del ciclo 2 presentó concentraciones de N₂O ligeramente superiores a las del ciclo 1, aunque durante las últimas semanas éstas fueron muy similares.

No se observaron diferencias en la concentración de N₂O entre la sala control y las salas tratamiento. Únicamente en el ciclo 2 hubo una mayor concentración de este gas en la sala control del día 0 al 14, en la semana 3 ocurrió lo contrario y a partir del día 21 se igualaron las concentraciones.

De modo estadístico, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en ninguna variable estudiada (tratamiento, ciclo y semana).

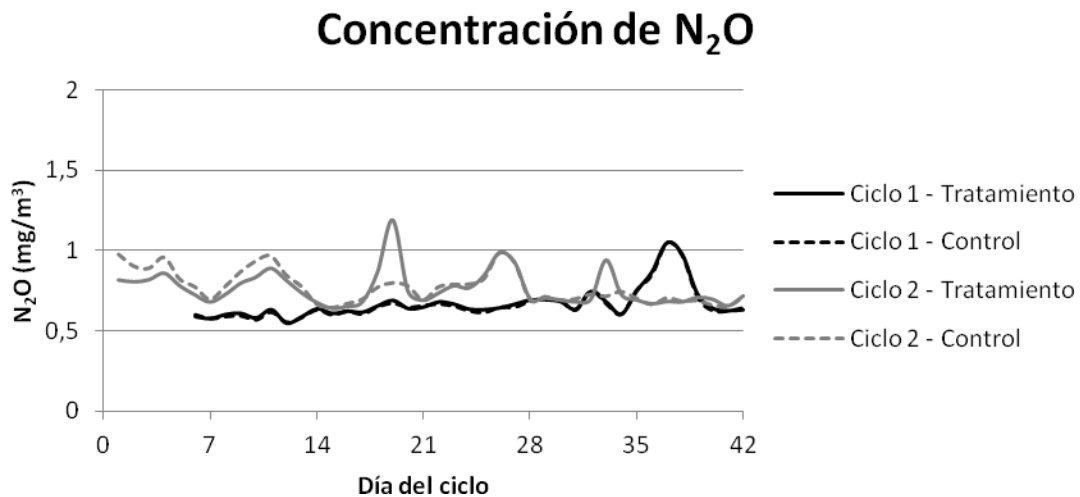


Figura 24. Concentración del gas N₂O diario en mg/m³ durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento

4.5.6. Emisión de N₂O

La evolución de emisiones de N₂O diarias durante los dos ciclos se observa en la **Figura 25**. En general, los valores se mantuvieron por debajo de 0,2 mg/animal/h, siendo muy pequeñas las diferencias entre los dos ciclos. Las máximas emisiones de N₂O fueron de 0,6 mg/animal/h en la tercera y quinta semana del segundo ciclo, mientras que en el ciclo 1 se alcanzó 1 mg/animal/h en la última semana tanto en la sala tratamiento como en el control. No se observaron diferencias entre tratamiento y control a lo largo del ciclo excepto en el ciclo 2 en los días 20 y 34, donde el tratamiento superó al control en la emisión de este gas.

Al igual que en la concentración, en la emisión de este gas no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en ninguna variable estudiada (tratamiento, ciclo y semana).

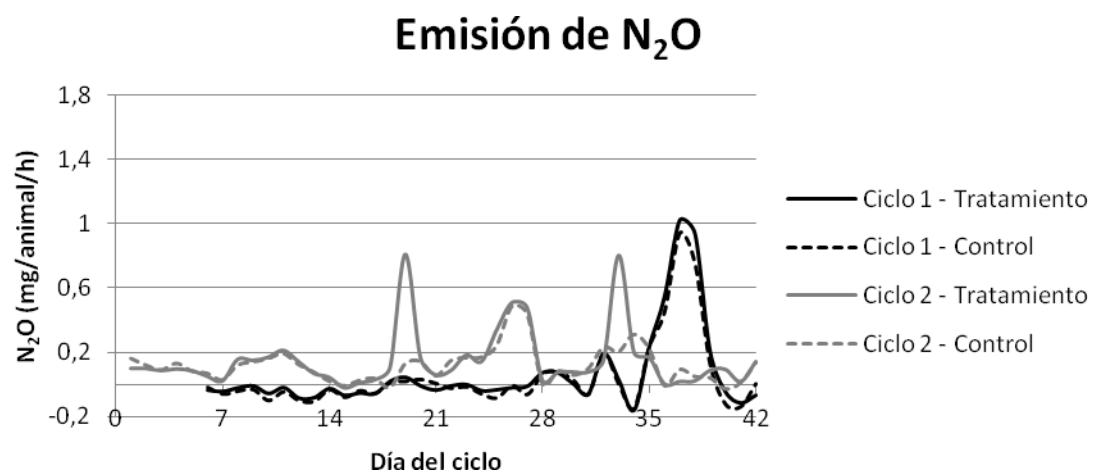


Figura 25. Emisión del gas N₂O diario en mg/animal/h durante el ciclo 1 y 2 diferenciando la sala control de la media de las salas tratamiento

5. DISCUSIÓN

5.1. *Parámetros ambientales*

Los resultados obtenidos de humedad relativa y temperatura interiores fueron similares para ambos tratamientos. En el caso de la temperatura, los valores obtenidos se encontraron ligeramente por encima de los valores registrados por Calvet *et al.* (2011), obtenidos en una granja de pollos comercial. Aunque las temperaturas no difirieron considerablemente entre los dos ciclos, sí que se detectó que las ventilaciones durante el segundo ciclo fueron ligeramente inferiores a las del primero. Esto pudo afectar a las características de la cama, estando ésta más seca en aquellas condiciones de mayor ventilación, y el efecto del volteo, dado el importante efecto que la ventilación tiene en las características de la cama.

5.2. *Parámetros físico-químicos de la cama*

El descenso de la cantidad de materia seca y el aumento del N Kjeldahl, de las cenizas y del pH a lo largo de ambos ciclos fue debido al aumento de las deyecciones de los animales conforme avanzaba el ciclo. Se observó que el contenido en materia seca de la cama evolucionó de forma distinta en los dos ciclos estudiados, de forma que el segundo ciclo tuvo la cama más húmeda que el primero (*media%* en el ciclo 1 frente a *media%* en el ciclo 2). Esto pudo deberse a las menores tasas de ventilación, tal como se ha comentado en el epígrafe anterior.

Aunque Koon *et al.* (1994) observaron que la aireación de la cama disminuía ligeramente el contenido de humedad, en este estudio no se encontraron diferencias entre tratamientos. Esto podría deberse a que los valores de materia seca fueron muy elevados, mayores que en las granjas comerciales, que se encuentran normalmente alrededor del 60%, como media (Tasistro *et al.*, 2004b). Por tanto la técnica del volteo no redujo el contenido de humedad de la cama, que era uno de los efectos esperables de este tratamiento.

5.3. *Material particulado suspendido en el aire*

En referencia al MP, los resultados de concentraciones de las fracciones de MP de este trabajo son superiores a las de otros estudios llevados a cabo por varios autores (Wathes *et al.*, 1997; Al Homidan *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 1998; etc) en el mismo tipo de alojamiento (explotaciones de pollos de engorde con cama) aunque en

distintos países (Inglaterra, Escocia, Países Bajos, Dinamarca, Alemania, Estados Unidos, Croacia y Australia) y bajo condiciones diferentes (Cambra-López *et al.*, 2009). En concreto, comparando las concentraciones de nuestro estudio con las de Takai *et al.* (1998) en el Norte de Europa, que estudiaron las emisiones y concentraciones de la fracción inhalable y respirable en diferentes especies, entre ellas el pollo de engorde, en varias explotaciones de distintos países de los anteriormente mencionados (Inglaterra, Países Bajos, Dinamarca y Alemania). La media de las fracciones de MP inhalable (TSP) y respirables (PM5) fueron de 3,60 mg/m³ y 0,45 mg/m³ respectivamente; en nuestro estudio la media del ciclo de MP inhalable fue similar en la sala control (3,75 mg/m³) y superiores en la sala tratamiento (4,36 mg/m³) y las medias de MP respirable (PM2,5) fueron menores (0,28 y 0,17 mg/m³ en la sala tratamiento y control respectivamente). No obstante, la no obtención de datos en el ciclo 2 pudo limitar los resultados obtenidos en este estudio. La técnica del volteo produjo como media concentraciones de MP más elevadas que en el control, probablemente debido al propio movimiento de la cama, que generaba una gran cantidad de MP puntualmente.

Debido a la posible relación del MP con enfermedades respiratorias principalmente, Donham *et al.*, (2000) recomendaron en los trabajadores de granjas de pollos para el PM inhalable (TSP) una concentración de 2,4 mg/m³ y para el respirable de 0,16 mg/m³. Estos límites fueron superados en diferentes momentos del ciclo, detectándose un aumento puntual de las concentraciones de MP durante la tarea del volteo. Estos picos, que llegaron a superar los 16 mg/m³ de PM10, podrían tener implicaciones en la salud humana y animal.

En nuestro estudio las emisiones de PM10 y PM2,5 (mg/día/animal) fueron más altas para PM2,5 en la semana 3 y 4 y para PM10 en la semana 3, aunque menores para PM10 en la semana 4 que en el estudio de Cambra-López, *et al.* (2009). Estas emisiones son importantes ya que pueden pasar al aire exterior, pudiendo provocar un peligro sanitario para el ser humano. Además, la Directiva de Calidad del Aire (2008/50/CE) propuso el valor límite diario en aire exterior de PM10 (50 µg/m³), no pudiéndose superar más de 35 veces por año, con un valor límite anual de 40 µg/m³. El valor límite anual para PM2,5 se fija en 25 µg/m³. Las emisiones de granjas de pollos de engorde pueden contribuir a empeorar la calidad del aire y a sobrepasar estos límites, con implicaciones desde el punto de vista de Salud Pública, aunque la técnica del volteo no parece tener ningún efecto claro sobre estas emisiones a largo plazo.

5.4. Microorganismos en la cama y el aire

Los resultados del estudio relativos a los microorganismos encontrados en aire y en la cama de los pollos de engorde, nos muestran las diferencias significativas entre semanas tanto para viables, como para mohos y levaduras y enterobacterias, sin encontrar una diferencia entre tratamiento y control. Esta diferencia entre semanas se puede deber al mayor peso de los animales, que implica una mayor cantidad de cama y deyecciones conforme avanza el ciclo.

En nuestro estudio la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos en cama y enterobacterias fueron menores que los obtenidos por Omeira *et al.*, 2006, en el cual se compararon los aspectos microbiológicos entre distintos sistemas (intensivo y extensivo) y distintas aves (gallinas/pollos de engorde). El resultado de coliformes se puede comparar con el de enterobacterias, ya que estos pertenecen a la misma familia.

Por otra parte, las lecturas de microorganismos viables, y mohos y levaduras en aire fueron similares o ligeramente menores al principio del ciclo que en el trabajo de Vučemilo *et al.*, 2007 en pollos de engorde. Sin embargo, las concentraciones fueron ligeramente mayores que las indicadas por estos autores al final del ciclo de cría.

En nuestro estudio las emisiones de microorganismos fueron concordantes, aunque inferiores, con los valores obtenidos por Cambra-López *et al.* (2009). Estos autores obtuvieron unas emisiones medias de viables aerobios mesófilos entre 20,2 y 25,4 log UFC/h por animal, y entre 10,9 y 18,0 log UFC/h por animal de mohos y levaduras. Así pues, tanto los valores obtenidos como su evolución durante el ciclo productivo se encuentran dentro de los valores habituales de microorganismos en aire.

El efecto de la aireación de la cama en la cantidad de microbiota también fue estudiado por Kwak *et al.*, (2004). En particular, estudiaron el efecto de supervivencia de las bacterias entéricas en la cama con aireación y sin aeración de ésta, inoculando las enterobacterias. Estos autores no encontraron diferencias entre las concentraciones de enterobacterias patógenas, tanto en cama aireada como sin airear, lo cual concuerda con los bajos recuentos de enterobacterias obtenidos en nuestro estudio. Al igual que en éste trabajo, no observamos presencia de *Salmonella spp.* en la cama.

A pesar de los estudios anteriores, no se han encontrado referencias bibliográficas sobre la relación entre cantidad de microbiota en cama y en aire. Los resultados del presente estudio parecen indicar una relación directa entre la cantidad

de microbiota en cama y en aire. Esto se confirma teniendo en cuenta que la cama es una de las principales fuentes de material particulado en el aire, y por tanto también de microorganismos. Así pues, parece que es necesario profundizar en estudiar los mecanismos que conducen a la emisión de microorganismos desde la cama. Igualmente, estos estudios pueden ser interesantes para establecer medidas de control sanitario de enfermedades transmisibles por el aire.

5.5. Gases

La distribución temporal de las emisiones durante los ciclos 1 y 2 puede permitir un mejor entendimiento de los procesos que conducen a estas emisiones. El aumento de emisiones de NH_3 se traduce en un incremento de las concentraciones, que alcanzan valores superiores al límite establecido por el Anexo II del Real Decreto 692/2010, por el que se establecen las normas mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne. El límite indicado ($20 \text{ ppm} = 13.8 \text{ mg/m}^3$), se superó de forma continuada desde el día 40 del ciclo 1 hasta el final y desde el día 36 del ciclo 2 hasta el final del ciclo.

En la **Tabla 9** podemos ver las emisiones medias de nuestro trabajo con los distintos gases. La diferencia entre ciclos en el NH_3 podrían deberse al desigual estado de la cama entre ambos. El segundo ciclo, con mayor humedad en la cama, potenció que las emisiones de NH_3 fueran mayores. Si comparamos las emisiones de NH_3 con una revisión de datos de emisiones desde el año 1997 (Calvet *et al.*, 2011) (**Tabla 10**), éstas fueron en general similares a los países europeos durante el ciclo 1, y en el ciclo 2 fueron similares al estudio realizado en España, y superiores a los países europeos aunque menores que en Estados Unidos. Éstas similitudes y diferencias se pueden deber a las diferentes prácticas de manejo llevadas a cabo en cada país. Así, en los países del Norte de Europa son habituales los ciclos productivos cortos, que llevan asociada una menor emisión de este gas. Por el contrario, en Estados Unidos se utilizan ciclos de duración similar a las granjas españolas, pero el material de cama se suele reutilizar en ciclos consecutivos. Esto lleva asociadas unas mayores emisiones por ciclo productivo.

Tabla 9. Emisiones medias de NH₃, CO₂ y N₂O (mg/animal/h) en el ciclo 1 y 2, diferenciando tratamiento y control.

Ciclo	Tratamiento	NH ₃	CO ₂	N ₂ O
1	Control	3,36	5356	0,04
1	Volteo	7,23	5687	0,06
2	Control	16,13	5371	0,12
2	Volteo	16,98	5638	0,16

Tabla 10. Revisión de datos experimentales de las emisiones de NH₃ de la producción de broilers en el periodo de engorde (Calvet, *et al.*, 2011).

País	Emisión NH ₃	Duración del ciclo	Referencia
Reino Unido	22,4	30	Wathes <i>et al.</i> (1997)
Reino Unido	8,1	35	Demmers <i>et al.</i> (1999)
Reino Unido	3,5–3,9	42	Robertson <i>et al.</i> (2002)
Reino Unido	19,8	-	Groot Koerkamp <i>et al.</i> (1998)
Holanda	11,2	-	
Dinamarca	8,9	-	
Alemania	18,5	-	
Francia	8,3	35	Guiziou y Béline (2005)
Irlanda	8,9–19,8	35	Hayes <i>et al.</i> (2006)
EEUU	25,2	41	Coufal <i>et al.</i> (2006)
EEUU	37,4	42	Siefert <i>et al.</i> (2004)
EEUU	26,3	49	Lacey <i>et al.</i> (2003)
EEUU	18,1–26,5	36–44	Gates <i>et al.</i> (2008)
EEUU	14,9	42	Mitran <i>et al.</i> (2008)
Canadá	14,2	47	Harper <i>et al.</i> (2010)
Canadá	4,9–5,2	31–34	Roumeliotis <i>et al.</i> (2010)
España	18,1–19,8	48–49	Calvet <i>et al.</i> (2011)

La evolución de la emisión de CO₂ fue muy distinta a la del NH₃. La emisión de este gas se incrementó de forma aproximadamente lineal con la edad de los animales, siendo mayor al final de éste por el mayor peso metabólico de los animales. Sin embargo, las mayores concentraciones se dieron al principio de los ciclos, dado que pese a la menor emisión la ventilación se mantuvo a niveles bajos propios de esta parte del ciclo. En el ciclo 1 no se superaron los valores máximos de CO₂ establecidos por el antes mencionado Real Decreto 692/2010 (3000 ppm = 5400 mg/m³), pero en el ciclo 2 se superaron los días 11 y 18 en el tratamiento. Finalmente, las concentraciones de N₂O fueron sistemáticamente inferiores a 1 mg/m³, siendo estos

valores muy cercanos al límite de detección del equipo. Las emisiones acumuladas de N_2O , por tanto, no fueron relevantes.

A la vista de los resultados obtenidos, la acumulación de gases, especialmente NH_3 , puede tener implicaciones sobre la salud y el bienestar de los animales, sin que haya un efecto significativo de la técnica del volteo en las concentraciones de este gas, según los ensayos realizados en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

En las condiciones de este estudio y como resultado de la evaluación del efecto de la técnica de volteo de la cama sobre la calidad del aire en la cría de pollos de engorde, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún parámetro ambiental (ventilación, temperatura y humedad relativa) y del material de la cama durante los dos ciclos de producción entre las salas tratamiento y la sala control.
2. El volteo produce un aumento puntual en la concentración de material particulado, por encima de los límites recomendados para la protección de trabajadores y animales. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, en los valores promedio de concentraciones y emisiones de TSP, PM10 ni de PM2,5.
3. Los microorganismos en la cama evolucionaron de forma similar a los del aire, aunque no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, ni en el recuento ni en las emisiones de bacterias aerobias viables, mohos y levaduras, y enterobacterias en el aire.
4. Las concentraciones y emisiones de NH₃, CO₂ y N₂O evolucionaron de forma similar entre tratamientos. No se encontraron diferencias significativas en los valores promedios de concentraciones y emisiones de estos gases.
5. La técnica del volteo no altera de forma significativa las concentraciones ni las emisiones de material particulado, microorganismos y gases. Las implicaciones sobre la salud humana y animal, y sobre el medio ambiente deben ser evaluadas en mayor profundidad.
6. La técnica del volteo de la cama, desde un punto de vista de calidad del aire, no es recomendable en situaciones prácticas con valores elevados de materia seca de la cama como los encontrados en este estudio.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACGIH, (2006). Threshold limit values and biological exposure indices. In: American Conference of Governmental Industrial Hygienists ACGIH, Cincinnati, Ohio.
- Al-Homidan, A., Robertson, J.F., Petchey, A.M. (2003). Review of the effect of ammonia and dust concentrations on broiler performance. *Worlds Poultry Science Journal* 59, 340-349.
- Al-Homidan, A., Robertson, J.F., Petchey, A.M. (1998). The effect of environmental factors on ammonia and dust production and broiler performance. *British Poultry Science* 39:S9-S10.
- Allen, W.H., Hughes, B.L., Chastain, J.P., Skewes, P.A., Bridges, W.C., Armstrong, R., Thomas, J, (1998). Aeration of poultry broiler litter to reduce production of odor and hazardous gas. ASAE Annual International Meeting, St. Joseph, Michigan.
- Andersen, C. I., Von Essen, S. G., Smith, L. M., Spencer, J., Jolie, R., y Donham, K. J. (2004). Respiratory symptoms and airway obstruction in swine veterinarians: A persistent problem. *American Journal of Industrial Medicine* 46(4), 386-392.
- ASABE, American Society of Agricultural and Biological Engineers, (2007). Standard: Management of manure odors- ASAE EP379.4 JAN 2007.
- Banhazi, T. M., Seedorf, J., Laffrique, M., Rutley, D. L. (2008). Identification of the risk factors for high airborne particle concentrations in broiler buildings using statistical modelling. *Biosystems Engineering* 101, 100-110.
- Baykov, B., Stoyanov, M., (1999). Microbial air pollution caused by intensive broiler chicken breeding. *FEMS Microbiology Ecology* 29, 389-392.
- Baykov, B., Tyrawska, D. (1991). *Ecological Studies on Anthropogenic Ecosystems for Production of Poultry Meat and Eggs*. Institute of Ecology, Publishing Office, Warsaw.
- Bieszczad, S., Sobotaj. (1999) Hazards, protection and forming of nature-agricultural environment (In Polish). Wyd. Akademii Rolniczej we Wroc3awiu, Wroc3aw
- Boletín Epidemiológico Semanal, (2009). *Infecciones por Salmonella no tifoidea de origen humano en España*. Sistema de Información Microbiológica. 2000-2008. Vol 17. N°17 /pp. 193-204
- Brown Mogens, J.K.M Hovmøller, S. (2002). Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, 297, 537–541.

- Calvet, S., Cambra-Lopez, M., Estelles, F., Torres, A. G. (2011). Characterization of gas emissions from a Mediterranean broiler farm. *Poultry Science* 90, 534-542.
- Cambra-López, M., Aarnink, A. J. A., Zhao, Y., Calvet, S., Torres, A. G. (2010). Airborne particulate matter from livestock production systems: A review of an air pollution problem. *Environmental Pollution* 58, 1-17.
- Cambra-López, M., Hermosilla, T., Lai, H. T. L., Aarnink, A. J. A., Ogink, N. W. M. (2011). Particulate Matter Emitted From Poultry and Pig Houses: Source Identification and Quantification. *Transactions of the ASABE* 54, 629-642.
- Cambra-López, M., Winkel, A., Van Harn, J., Ogink, N.W.K, Aarnink, A.J.A, (2009). Ionization for reducing particulate matter emissions from poultry houses. *Transactions of the ASABE* 52, 1757-1771.
- CIGR. (2002). Climatization of animal houses. Heat and moisture production at animal and house levels. Pedersen, S. y Sälvik, K. Danish Institute of Agricultural Sciences, pp. 1-46. Horsens, Denmark.
- Costa, A. Guarino, M. (2009). Definition of yearly emission factor of dust and greenhouse gases through continuous measurements in swine husbandry. *Atmospheric Environment* 43, 1548-1556.
- Coufal, C. D., C. Chavez, P. R. Niemeyer, J. B. Carey (2006). Nitrogen emissions from broilers measured by mass balance over eighteen consecutive flocks. *Poultry Science* 85, 384–391.
- De la Rosa M.C., Mosso, M.A., Ullán, C. (2002). El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental* 5, 375-402.
- Demmers, T. G. M., L. R. Burgess, J. L. Short, V. R. Philips, J. A. Clark, C. M. Wathes. (1999). Ammonia emissions from two mechanically ventilated UK livestock buildings. *Atmospheric Environment* 33:217–227.
- Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del consejo relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa.
- Donham, K. J., Cumro, D., Reynolds, S. J., Merchant, J. A. (2000). Dose-response relationships between occupational aerosol exposures and cross-shift declines of lung function in poultry workers: Recommendations for exposure limits. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 42, 260-269.
- EEA. (2008). Annual European Community LRTAP Convention Emission Inventory report 1990 - 2006. EEA Technical Report No 7/2008, European Environment Agency, pp. 1-82. Copenhagen.
- Ellen, H. H., Bottcher, R. W., von Wachenfelt, E., Takai, H. (2000). Dust levels and control methods in poultry houses. *Journal of Agricultural Safety and Health* 6, 275-282.

- Elliott, H. A. Collins, N. E. (1982). Factors Affecting Ammonia Release in Broiler Houses. Transactions of the ASAE 25, 413-418.
- EN 12341:1999. (1999). Calidad del aire. Determinación de la fracción PM 10 de la materia particulada en suspensión. Método de referencia y procedimiento de ensayo de campo para demostrar la equivalencia de los métodos de medida al de referencia.
- EN, (1993). Size Fraction Definitions for Measurement of Airborne Particles. EN 481. Workplace Atmospheres. 14 pp.
- EPA. (2004). Air quality criteria for particulate matter. Volume I of II. United States Environmental Protection Agency, EPA/60D/P-99/002aF, pp. 1-900. Washington D.C.
- EPA. (2004). Air quality criteria for particulate matter. Volume II of II. United States Environmental Protection Agency, EPA/60D/P-99/002bF, pp. 1-1148. Washington D.C.
- Gates, R. S., Casey, K. D., Wheeler, E. F., Xin, H., Pescatore, A. J. (2008). U.S. broiler housing ammonia emissions inventory. Atmospheric Environment 42, 3342–3350.
- Grantz, D. A., Garner, J. H. B., Johnson, D. W. (2003). Ecological effects of particulate matter. Environment International 29, 213-239.
- Groot Koerkamp, P. W. G. G. (1994). Review on Emissions of Ammonia from Housing Systems for Laying Hens in Relation to Sources, Processes, Building Design and Manure Handling. Journal of Agricultural Engineering Research 59, 73-87.
- Groot Koerkamp, P. W. G. G., Metz, J. H. M., Uenk, G. H., Phillips, V. R., Holden, M. R., Sneath, R. W., Short, J. L., White, R. P., Hartung, J., Seedorf, J., Schroder, M., Linkert, K. H., Pedersen, S., Takai, H., Johnsen, J. O., Wathes, C. M. (1998). Concentrations and emissions of ammonia in livestock buildings in Northern Europe. Journal of Agricultural Engineering Research 70, 79-95.
- Guiziou, F., Beline, F. (2005). In situ measurement of ammonia and greenhouse gas emissions from broiler houses in France. Bioresource Technology 96, 203–207.
- Harms, R.H., Damron, B.L., Simpson, C.F. (1977). Effect of wet litter and supplemental biotin and/or whey on the production of foot pad dermatitis in broilers. Poultry Science 56, 291–296.
- Harper, L. A., Flesch, T. K., Wilson, J. D. (2010). Ammonia emissions from broiler production in the San Joaquin Valley. Poultry Science 89, 1802–1814.
- Harry, E. G. (1978). Air-Pollution in Farm-Buildings and Methods of Control - Review. Avian Pathology 7, 441-454.

- Hartung, J. (1986). Dust in livestock buildings as a carrier of odours. En: Odour prevention and control of organic sludge and livestock farming. Editores: V.C.Nielsen, J.H.Voorburg, y P.L'Hermite, pp. 321-332.
- Hayes, E. T., Curran, T. P., Dodd, V. A. (2006). Odour and ammonia emissions from intensive poultry units in Ireland. *Bioresource Technology* 97, 933–939.
- Heber, A. J., Lim, T. T., Ni, J. Q., Tao, P. C., Schmidt, A. M., Koziel, J. A., Hoff, S. J., Jacobson, L.D., Zhang, Y.H., Baughman, G.B. (2006). Quality-assured measurements of animal building emissions: Particulate matter concentrations. *Journal of the Air & Waste Management Association* 56, 1642-1648.
- Hirst, J.M. (1995). Bioaerosols: introduction, retrospect and prospect. In C.S. Cox & C.M. Wathes, eds. *Bioaerosols handbook*, pp. 5–14. Boca Raton, FL, USA. CRC Press.
- Hoff, S.J., Bundy, D.S., Li, X.W. (1997). Dust effects on odor and odor compounds. In: *Ammonia and Odour Emission from Animal Production Facilities* (Voermans J A M; Monteny G J eds), pp 677-684, Rosmalen, The Netherlands.
- IPCC (2005). Report of the IPCC Expert Meeting on emission estimation of aerosols relevant to climate change. IPCC, pp. -34. Geneva, Switzerland.
- ISO (1995). ISO 7708. Air Quality – Particle Size Fraction Definitions for Health-related Sampling, 9 pp.
- Jones, A.M., Harrison, R.M., (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. *Sci. Total Environ*, 326,151–180.
- Koon, J.L., Flood, C.A., McCaskey, T.A., Brewer, R.N., (1994). Changes in Physical and Chemical Characteristics of Poultry Litter Due to Rotary Tilling. *Society of Agricultural Engineers* 94, 3701-0269.
- Krupa, S. V. (2003). Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: a review. *Environmental Pollution* 124, 179-221.
- Kwak, W.S., Huh, J.W., McCaskey, T.A. (2005) Effect of processing time on enteric bacteria survival and on temperature and chemical composition of broiler poultry litter processed by two methods. *Bioresource Technology* 96, 1569-1536.
- Lacey, R. E., Redwine, J. S., Parnell, C. B. (2003). Particulate matter and ammonia emission factors for tunnel-ventilated broiler production houses in the southern U.S. *Transactions of the ASAE* 46:1203–1214.
- Lange J. L., Thorne P. S., Kullman G. J. (1997). Determinants of Culturable Bioaerosol Concentrations in Dairy Barns. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 4, 2.

- Lighthart, B, Mohr, A.J. (Eds.), (1994). Atmospheric Microbial Aerosols, Theory and Applications. Chapman and Hall, New York.
- Martin, R. S., Silva, P. J., Moore, K., Erupe, M., Doshi, V. S. (2008). Particle composition and size distribution in and around a deep-pit swine operation. *Journal of Atmospheric Chemistry* 59, 135-150.
- Mckay (2008). XXIII Congreso Mundial de Avicultura Brisbane, Australia, 30/6 a 4/7.
- Mitran, L., Harter-Dennis, J.L., Meisinger, J.J. (2008). Determining the nitrogen budget and total ammoniacal nitrogen emissions from commercial broilers grown in environmental chambers. *Journal of the Applied Poultry Research* 17, 34–46.
- Mohr, A. J. (1997): Fate and transport of microorganisms in air. En: Hurst, C. J. et al. (ed). *Manual of environmental microbiology*. American Society for Microbiology, Washington.
- Omeira, N., Barbour, E.K., Nehme, P.A., Hamadeh, S.K., Zuraik, R., Bashour, I. (2006). Microbiological and chemical properties of litter from different chicken types and production systems. *Science of the Total Environment* 367, 156-162.
- Patterson, P. H., Adrizal (2005). Management strategies to reduce air emissions: Emphasis - dust and ammonia. *Journal of Applied Poultry Research* 14(3), 638-650.
- Pescatore, A. J., Casey, K. D., Gates, R. S. (2005). Ammonia emissions from broiler houses. *Journal of Applied Poultry Research* 14, 635-637.
- Pidwirny (2006). The Nitrogen Cycle. *Fundamentals of Physical Geography*, 2nd Edition. <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/9s.html>.
- Quarles, C. L., Caveny, D. D. (1979). Effect of air contaminants on performance and quality of broilers. *Poultry Science* 58, 543-548.
- Quinn, P.J., Mackey, B.K, Carter, M.E, Donnelly, W.J, Leonard, F.C., (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. Blackwell science, Chapter 18 y 37.
- Radon, K., Danuser, B., Iversen, M., Jorres, R., Monso, E., Opravil, U., Weber, C., Donham, K. J., Nowak, D. (2001). Respiratory symptoms in European animal farmers. *European Respiratory Journal* 17, 747-754.
- Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire.
- Real Decreto 1299/2006, de 10 de noviembre, por el que se aprueba el cuadro de enfermedades profesionales en el sistema de la Seguridad Social y se establecen criterios para su notificación y registro.

- Real Decreto 692/2010, de 20 de mayo, por el que se establecen las normas mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne.
- Reuss, J. O., Johnson, D. W. (1986). *Acid Deposition and the Acidification of Soils and Waters*. Springer-Verlag, New York.
- Ritz, W.C., Fairchild, B.D., Lacy, M.P. (2005). Litter quality and broiler performance. Cooperative Extension Service/The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences, 1267.
- Robertson, J. F., D. Wilson, and W. J. Smith (1990). Atrophic rhinitis—The influence of the aerial environment. *Animal Production* 50, 173–182.
- Roney, N., Lladós, F., Little, S. S., Knaebel, D. B. (2004). *Toxicological Profile of Ammonia*, U.S. Department of Health and Human Services, pp. 1-269.
- Roumeliotis, T. S., Dixon, B. J., Van Heyst, B. J. (2010). Characterization of gaseous pollutant and particulate matter emission rates from a commercial broiler operation part I: Observed trends in emissions. *Atmospheric Environment* 44, 3770-3777.
- Schneider, F., Engelhardt, T., Wieser, P. (2001). Characterization of aerosol particles from animal husbandry with single particle analytic techniques. In: *Proceedings of 2001 ASAE*, St. Joseph, Michigan.
- Seedorf, J, Hartung, J, Schröder, M., Linkert, K.H., Phillips, V.R., Holden, M.R, Sneath, R.W., Short, J.L., White, R.P, Pedersen, S., Takai, H., Johnsen, J.O, Metz, J.H.M, Groot Koerkamp, P.W.G. , Uenk, G.H. , Wathes, C.M. (1998). Concentrations and emissions of airborne endotoxins and microorganisms in livestock buildings in Northern Europe. *Journal of Agricultural Engineering Research* 70, 97-109.
- Seinfeld, J.H.; Pandis, S.N. (1998). *Atmospheric Chemistry and Physics of Air Pollution*.2, John Wiley y Sons, pp. 1-1326.
- Shaffer, B. T., Lighthart, B. (1997). Survey of Culturable Airborne Bacteria at Four Diverse Locations in Oregon: Urban, Rural, Forest and Coastal. *Microbial Ecology*, 34.
- Siefert, R. L., Scudlark, J. R., Potter, A. G., Simonsen, K. A., Savidge, K. B. (2004). Characterization of atmospheric ammonia emissions from a commercial chicken house on the Delmarva Peninsula. *Environmental Science and Technology* 38, 2769–2778.
- Solomon, S., D. Qin, M. Manning, R.B. Alley, T. Berntsen, N.L. Bindoff, Z. Chen, A. Chidthaisong, J.M. Gregory, G.C. Hegerl, M. Heimann, B. Hewitson, B.J. Hoskins, F. Joos, J. Jouzel, V. Kattsov, U. Lohmann, T. Matsuno, M. Molina, N. Nicholls, J. Overpeck, G. Raga, V. Ramaswamy, J. Ren, M. Rusticucci, R. Somerville, T.F. Stocker, P. Whetton, R.A. Wood, D. Wratt, (2007): Technical Summary. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor

and H.L. Miller (eds.]). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

- Takai, H., Nekomoto, K., Dahl, P. J., Okamoto, E., Morita, S., Hoshiba, S. (2002). Ammonia contents and desorption from dusts collected in livestock buildings.. CIGR e-journal [electronic resource].
- Takai, H., Pedersen, S., Johnsen, J. O., Metz, J. H. M., Koerkamp, P. W. G. G., Uenk, G. H., Phillips, V. R., Holden, M. R., Sneath, R. W., Short, J. L., White, R. P., Hartung, J., Seedorf, J., Schroder, M., Linkert, K. H., Wathes, C. M. (1998). Concentrations and emissions of airborne dust in livestock buildings in Northern Europe. *Journal of Agricultural Engineering Research* 70, 59-77.
- Tasistro, A.S., Kissel, D.E., Bush, P.B. (2004a). Sampling broiler litter: How many samples are needed?. *Journal of Applied Poultry Research* 13, 163-170.
- Tasistro, A. S., Kissel, D. E., y Bush, P. B. (2004b). Spatial variability of broiler litter composition in a chicken house. *Journal of Applied Poultry Research* 13, 29-43.
- Van Middelkoop, K. (1994). New concept in poultry housing: the ventilated litter floor. *World Poultry Misset* 10, 32-33.
- Vucemilo, M., Matkovic, K., Vinkovic, B., Jaksic, S., Granic, K., Mas, N. (2007) The effect of animal age on air pollutant concentration in a broiler house. *Czech J.Anim.Sci.* 52, 170-174.
- Wathes C.M., Holden M.R., Sneath R.W., White R.P., Phillips V.R. (1997). Concentrations and emission rates of aerial ammonia, nitrous – oxide, carbon dioxide, dust and endotoxin in UK broiler and layer houses. *British Poultry Science* 38, 14–28.
- Whyte, R. T. (2002). Occupational exposure of poultry stockmen in current barn systems for egg production in the United Kingdom. *British Poultry Science* 43, 364-373.
- Williams, A. G. (1989). Dust and odour relationships in broiler house air. *Journal of Agricultural Engineering Research* 44, 175-190.
- World Health Organization Regional Office for Europe (2007) Development of WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Report on a working group meeting. Bonn, Germany.
- Zhang, Y. (2004). *Indoor Air Quality Engineering*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 618 pp.

8. ANEJOS

Anejo 1: Calendario del experimento

Tabla 11. Calendario con las actividades realizadas en las salas de tratamiento (T, T1 y T2) y control (C).

			1 Entrada de animales Control de consumos	2	3	4
5	6	7 Muestreo cama Control de consumos	8	9	10	11
12 TEOM Sala T Respicon 3 alturas Impingers salas T y C	13 TEOM Sala T Respicon	14 Muestreo cama Control de consumos	15 TEOM Sala T Respicon Salas T y C	16 TEOM Sala T Respicon Sala T y C	17 TEOM Sala C	18 TEOM Pasillo
19 Volteo sala T1 Respicon Impingers salas T y C	20 Volteo sala T2 TEOM Sala T Respicon	21 Muestreo cama TEOM sala control Control de consumos	22 TEOM Sala T Respicon Sala T y C	23 TEOM Sala T Respicon Sala T y C	24 TEOM Sala C	25 TEOM Pasillo
26 Volteo sala T2 Respicon 3 alturas Impingers salas T y C	27 Volteo sala T1 TEOM Sala T Respicon	28 Muestreo cama TEOM sala C Control de consumos	29 TEOM Sala T Respicon Sala T y C	30 TEOM Sala tratamiento Respicon Sala T y C	31 TEOM Sala control	32 TEOM Pasillo
33 Volteo sala T1 Respicon 3 alturas Impingers salas T y C	34 Volteo sala T2 TEOM Sala T Respicon (8.00h)	35 Muestreo cama TEOM sala control Control de consumos	36 TEOM Sala T Respicon Sala T y C	37 TEOM Sala T Respicon Sala T y C	38 TEOM Sala C	39 TEOM Pasillo
40 Volteo sala T2 Respicon Impingers salas T y C	41 Volteo sala T1 TEOM Sala T Respicon	42 Cama, consumos, TEOM sala C	43 TEOM Sala T Respicon Salas T y C	44 TEOM Sala T Respicon Salas T y C Control de consumos	45 Matadero TEOM Sala C	46 TEOM Pasillo

Anejo 2: Composición de los medios de cultivo

A2.1. Material general empleado en recuento y lectura de microorganismos

Agitador magnético calefactado (magnetoagitador A-06)

Autoclave "Selecta" Autotester-E

Alcohol

Balanza de precisión (Sartorius GF-300; precisión máx. 310 g, mín. 0.02 g)

Bandejas

Bolsas stomacher

Botes de cristal de 90 ml

Espátula

Estufas de cultivo para 30 °, 37° C y 42° C

Gradillas

Matraces de 200ml, 500ml, 1l

Mechero

Microondas

Placas petri de 55x14 mm

Pinzas

Pipetas

Puntas paja

Stomacher

Tubos agua destilada 9 ml estériles

A2.2. Medio para el recuento de viables mesófilos aerobios

Plate Count Agar (PCA) (Merck):

Peptona de caseína 5 g

Extracto de levadura 2,5g

D(+)-glucosa	1 g
Agar-agar	14 g
Agua destilada	1 L

Se introduce en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, manteniéndolo en el baño a 45°C hasta su empleo.

A2.3. Medio para el recuento de enterobacterias

Violeta Rojo y Bilis Glucosa agar (VRBG) (Merck):

Peptona de carne	7 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Glucosa	10 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Violeta cristal	0,002 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada	1 L
pH final 7,3	

El medio se esteriliza mediante hervido en microondas y se mantiene en baño a 45 ° C hasta su utilización.

A2.4. Medio para el recuento de mohos y levaduras

Sabouraud 4%(SB) (Merck):

Peptona de caseína	5 g
Peptona de carne	5 g
D-glucosa	4 g
Agar-agar	15 g

Agua destilada 1L

- Al medio se le añade 0,5 gr/L de cloranfenicol (Panreac), se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente se introduce en el baño a 45 ° C hasta su utilización.

A2.5. Medios selectivos de Salmonella:

Salmonella Chromogenic agar base:

Peptona especial	10g
Mezcla cromogénica	10g
Agar	12g
pH final: 7,2+/-0,2	

Suplemento selectivo de Salmonella:

Cefsulodina	12mg/l
Novobiocina	5mg/l

Se añade el contenido de un vial de suplemento selectivo de *Salmonella* reconstituido según las instrucciones. Se calienta mediante hervido en microondas y posteriormente se enfría a 45°C para verterlo en las placas Petri.

XLD agar (Xilosa-Lisina-Desoxicolato):

Peptona	1g
Extracto de levadura	2g
Lactosa	7,5g
Xilosa	3,75g
Cloruro de sodio	5g
L-Lisina	5g
Sulfato de sodio	4,34g
Citrato férrico de amonio	0,8g
Desoxicolato de sodio	1g
Rojo de fenol	0,072g
Agar A	15g

Ph final: 7,3+/- 0,2

Se esteriliza hirviendo en microondas y se mantiene en baño a 45° hasta su utilización.

TSI agar (agar- hierro triple azúcar):

Extracto de carne	3g
Pluripeptona	20g
Cloruro de sodio	5g
Lactosa	10g
Sacarosa	10g
Glucosa	1g
Sulfato de hierro y amonio	0,2g
Tiosulfato de sodio	0,2g
Rojo de fenol	0,025g
Agar	13g

Este medio se esteriliza mediante hervido en microondas hasta su disolución llenando tres partes de un tubo de ensayo, posteriormente se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121°C, enfriándolo por último en pico de flauta profundo (inclinando el tubo 45°).

Anejo 3: Siembra de las muestras

A3.1. Siembra de muestra de aire:

De cada muestra se realizaron diluciones decimales seriadas hasta llegar a la dilución adecuada según el tipo de microorganismo y la semana del ciclo en la que nos encontrábamos. Se realizó un pipeteado de 1 ml de cada tubo de ensayo con la dilución deseada en placas Petri (por duplicado). Este proceso se puede ver en la **Figura 26**.

A continuación se vertieron los medios de cultivo, en las placas y finalmente se incubaron a la temperatura adecuada según el tipo de microorganismo:

- **PCA (Plate Count Agar):** Medio de cultivo no selectivo, en el cual se desarrollan bacterias aerobias totales, la temperatura y tiempo óptimo para su crecimiento es de 30°C durante 48 horas.
- **VRBG (Violet Red Bile Glucose):** Medio de cultivo selectivo, en el cual crecen enterobacterias (Gram negativas), la temperatura y tiempo óptimo para su desarrollo es de 37°C durante 24 horas.
- **SB (Saboreaud agar) con Cloranfenicol:** Medio de cultivo selectivo en el cual se multiplican los hongos y las levaduras; la temperatura y tiempo óptimos para su crecimiento es de 30°C durante 48 horas.

El número de unidades formadoras de colonias por m³ se calculó en función del aire muestreado, el tiempo de muestreo y el flujo de aire:

$$UFC / m^3 = \frac{UFC \times V.muestra \times 1000}{V.sembrado \times FlujoAire \times t}$$

Siendo:

- UFC: Unidades formadoras de colonias contadas en la placa
- V.muestra: Volumen de la muestra (20 ml)
- V.sembrado: Cantidad de muestra sembrada en placa (1 ml)
- Flujo aire: Flujo de aspiración de la bomba (12,5 L/min)
- t: Tiempo de muestreo (15 min)

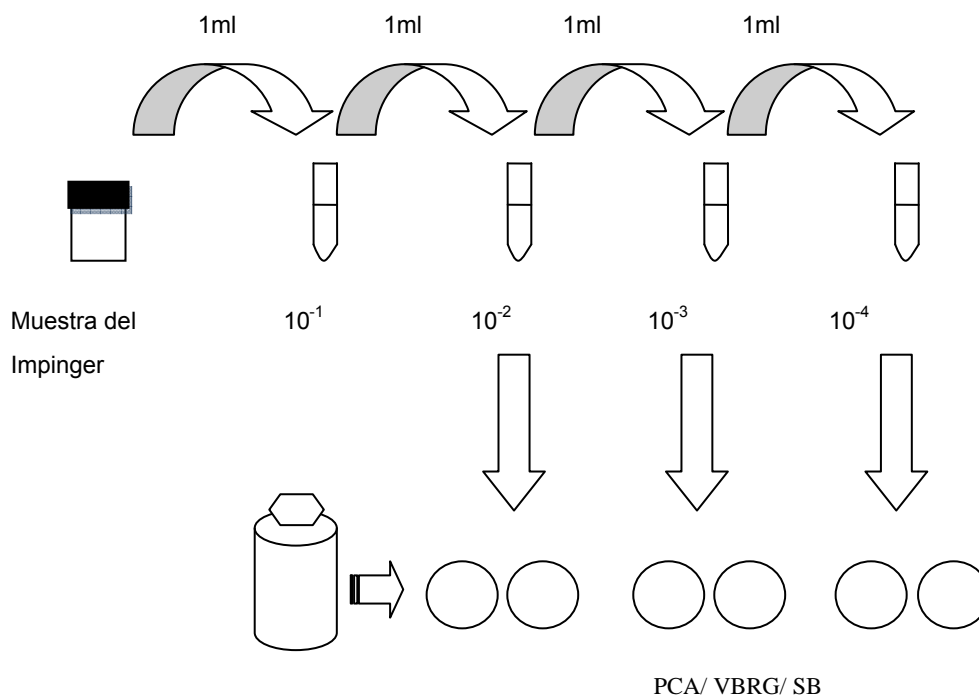


Figura 26. Método de siembra de muestra de aire

A3.2. Siembra de muestra de cama:

De cada muestra compuesta (una por sala) se pesaron 10 gramos y se añadieron 90 ml de agua de peptona consiguiendo una dilución de 10^{-1} . A partir de esta dilución, se realizaron diluciones decimales seriadas hasta llegar a la dilución adecuada según el tipo de microorganismo y semana del ciclo experimental. A continuación se realizó un pipeteado de 1 ml de cada tubo de ensayo con la dilución deseada en placas Petri (por duplicado) como indica la **Figura 27**.

Posteriormente se vertieron los siguientes medios de cultivo en las placas y finalmente se incubaron a la temperatura adecuada según el tipo de microorganismo:

- **PCA (Plate Count Agar):** Es un medio de cultivo no selectivo, en el cual se desarrollan aerobios mesófilos totales, la temperatura y tiempo óptimo para su crecimiento es de 30°C durante 48 horas. Se cuentan todas las colonias aparecidas.
- **VRBG (Violet Red Bile Glucose):** Es un medio selectivo, en el cual crecen enterobacterias (Gram negativas), la temperatura y tiempo óptimo para su crecimiento es de 37°C durante 24 horas. Las colonias positivas son de color rosa con precipitado.

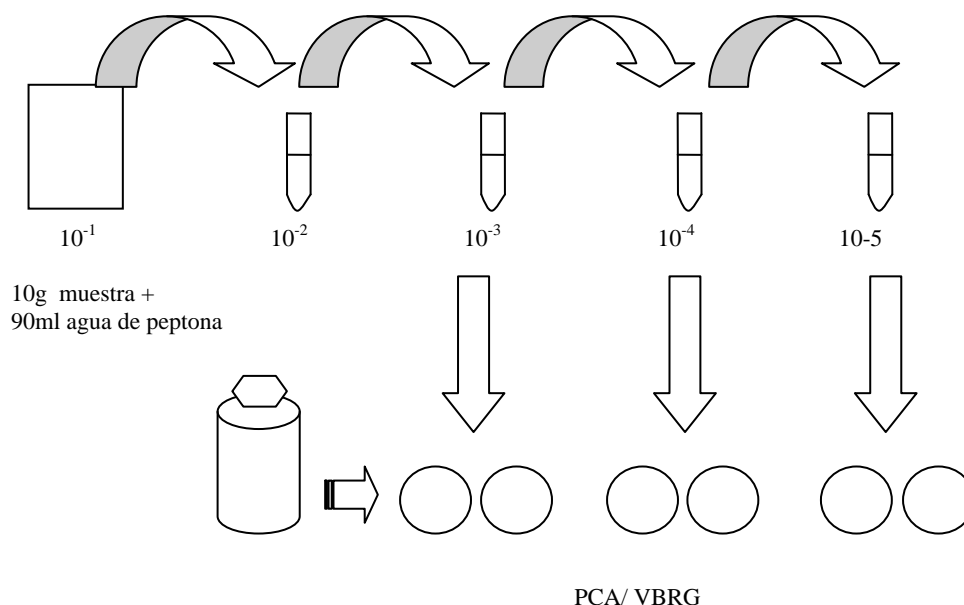


Figura 27. Método de siembra de muestra de cama

A3.3. Siembras posteriores:

Para diferenciar el género *Salmonella* del resto de la familia de enterobacterias durante el ciclo 2 se realizó una siembra en superficie por duplicado de 0,1ml de la dilución adecuada mediante un asa de drigalsky en placas Petri con el medio de cultivo de **Salmonella Chromogenic agar base** ya vertido. La temperatura y tiempo óptimos para su crecimiento es de 37°C durante 24 horas. Las colonias positivas son de color magenta y el resto de enterobacterias desde azulado a color rosado.

Aquellas colonias sospechosas de ser del género *Salmonella* se confirmaron mediante resiembras en distintos medios selectivos:

- **XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato):** es un medio selectivo diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos como *Salmonella*. La lectura es positiva a *Salmonella* cuando las colonias son rosas/rojas con el centro negro.
- **TSI (agar- hierro- triple azúcar):** es un medio no selectivo utilizado para la diferenciación de enterobacterias. La temperatura y tiempo óptimos para su crecimiento es de 37° durante 24 horas. La lectura de *Salmonella spp.* es pico rojo/fondo amarillo con ennegrecimiento y burbujas o ruptura del medio de cultivo.