



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

MASTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Evaluación de la concentración de bacterias aerobias mesófilas y *Salmonella enteritidis* en el ambiente de granjas de broilers con diferentes métodos y su relación con el material particulado

Tesis de Master
Valencia, Noviembre 2010

Elisa Adell Sales

Director:

Dra. María Cambra López

Director:

Dra. Alba Cerisuelo García

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo, sin cuyo apoyo hubiera sido imposible su realización.

A María y Alba, mis directoras, por su tiempo, apoyo y confianza en todo momento.

Al Centro de Investigación y Tecnología Animal, por ofrecernos sus instalaciones para llevar a cabo este estudio.

Al Centro Superior de Investigación en Salud Pública de la Generalitat Valenciana, especialmente a Vicente Lacueva, por facilitarnos los equipos para el pesaje de los filtros.

A Yang Zhao, de la Universidad de Wageningen, por su colaboración, en especial por la cesión del impactador en cascada.

A Verónica Moset, por su ayuda y compañía durante largas tardes de siembra.

A Fernando Estellés, por su ayuda en la puesta en marcha de los sensores de CO₂ y cálculo de la ventilación.

A María Lizondo, por su respaldo en el laboratorio de microbiología

A mis compañeros de despacho, por su compañía y alegría.

Resumen

El material particulado (PM) y los microorganismos en el aire son dos de los principales contaminantes en el ámbito de la ganadería. El PM puede ir asociado a numerosos microorganismos, en ocasiones patógenos como la *Salmonella*. La inhalación de los mismos constituye un efecto perjudicial para la salud. Los objetivos de este estudio fueron cuantificar la concentración de bacterias aerobias mesófilas, *Salmonella* y PM en el aire de una granja de broilers y estudiar su distribución y evolución en el tiempo, además de estudiar la relación existente entre ellos. Para ello se muestreó semanalmente utilizando diferentes metodologías, el aire en dos salas de una misma nave de broilers previamente infectados experimentalmente con *Salmonella enteritidis*. La concentración de bacterias aerobias mesófila en el aire varió entre 4 y 8,8 logUFC/m³ según el método utilizado. El rango de concentración de *Salmonella* en el aire se estimó entre 10¹ y 10³ logUFC/m³. Las concentraciones de PM y microorganismos en el aire aumentaron a lo largo del ciclo de producción. En general se observó que las bacterias aerobias mesófilas van asociadas al PM de mayor tamaño (entre 3,3 y >7 µm), mientras que *Salmonella* puede encontrarse vinculada a partículas de cualquier tamaño.

Abstract

Particulate matter (PM) and airborne microorganism are two of the major pollutants in livestock houses. The PM may carry several microorganisms, sometimes pathogenic, such as *Salmonella*. The inhalation of these causes harmful health effects. The aims of this study were to quantify the concentration of airborne mesophilic bacteria, *Salmonella* and PM in the air of a broiler farm, to study its distribution and evolution in time, and the existing relation among them. For this purpose, the air of two rooms of the same broiler farm infected experimentally with *Salmonella enteritidis*, was sampled weekly using different methods. The concentration of airborne mesophilic bacteria in the air ranged from 4 to 8,8 logUFC/m³. The range of *Salmonella* concentration in the air was estimated to be between 10¹ and 10³ logUFC/m³. The PM and bacteria concentration increased in time. In general an association was observed between the aerobic mesophilic bacteria and the PM of large size (between 3,3 y >7 µm). However, *Salmonella* might be carried by PM independently of its size.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. EL MATERIAL PARTICULADO Y LOS MICROORGANISMOS EN EL AIRE DE EXPLOTACIONES GANADERAS: LOS BIOAEROSOLES | 1 |
| 1.1.1. Material particulado | 2 |
| 1.1.2. Bioaerosoles | 4 |
| 1.2. PROBLEMAS ASOCIADOS CON LOS BIOAEROSOLES | 6 |
| 1.2.1. Efectos sobre la salud humana | 6 |
| 1.2.2. Efectos sobre los animales..... | 8 |
| 1.3. FACTORES RELACIONADOS CON LA PRESENCIA Y SUPERVIVENCIA DE MICROORGANISMOS EN EL AIRE | 8 |
| 1.4. PATÓGENOS EN GRANJAS DE BROILERS: SALMONELLA | 10 |
| 2. OBJETIVOS..... | 12 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 13 |
| 3.1. INSTALACIONES Y ANIMALES | 13 |
| 3.2. PARÁMETROS PRODUCTIVOS | 14 |
| 3.3. PARÁMETROS AMBIENTALES | 14 |
| 3.4. INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y MUESTREO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS | 15 |
| 3.4.1. Muestras de cama..... | 15 |
| 3.4.2. Muestras ambientales | 16 |
| 3.4.3. Muestras de superficies..... | 22 |
| 3.5. MEDICIÓN DE MATERIAL PARTICULADO | 22 |
| 3.5.1. Gravimetría: acumulado 24 horas | 22 |
| 3.5.2. Tapered element oscillating microbalance (TEOM): medición en continuo . | 24 |
| 3.6. ANALISIS ESTADÍSTICO | 27 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 28 |
| 4.1. PARÁMETROS PRODUCTIVOS | 28 |
| 4.2. PARÁMETROS AMBIENTALES | 28 |
| 4.3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS..... | 31 |
| 4.3.1. Muestras de cama..... | 32 |
| 4.3.2. Muestras ambientales | 34 |
| 4.3.3. Muestras de superficies..... | 41 |
| 4.4. MEDICIÓN DE MATERIAL PARTICULADO | 42 |
| 4.4.1. Gravimetría: acumulado 24 horas | 42 |
| 4.4.2. Tapered element oscillating microbalance (TEOM): medición en continuo . | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 5. CONCLUSIONES | 47 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 49 |
| ANEXOS | I |
| ANEXO A. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE SALMONELLA EN EL LABORATORIO: PRESENCIA/AUSENCIA..... | i |
| ANEXO B. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO | ii |
| B 1. Recuento en placa | ii |
| B 2. Número más probable | iii |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Niveles de concentración de microorganismos aerobios mesófilos más comunes en aire en explotaciones ganaderas según especie y sistema de muestreo. . | 5 |
| Tabla 2. Potenciales zoonosis transmitidas por el aire a través de bioaerosoles. | 7 |
| Tabla 3. Tiempos de exposición de las placas a lo largo del ciclo de crecimiento de los pollos para <i>Salmonella</i> y bacterias aerobias mesófilas cultivables..... | 17 |
| Tabla 4. Tiempo de muestreo semanal con el impactador en cascada a lo largo del ciclo de crecimiento de los pollos para detección de <i>Salmonella</i> y bacterias aerobias mesófilas cultivables. | 21 |
| Tabla 5. Resumen del material y métodos empleados, frecuencia y tiempo de muestreo a lo largo del ciclo de crecimiento de los pollos. | 26 |
| Tabla 6. Valores medios de consumo medio diario (CMD), ganancia media diaria (GMD) e índice de conversión (IC) durante todo el ciclo en las dos salas. | 28 |
| Tabla 7. Media de la ventilación, temperatura, humedad relativa y desviación estándar a lo largo del ciclo de producción de las dos salas..... | 31 |
| Tabla 8. Media (logUFC), error estándar de la media (EEM) y p-valor del recuento de bacterias aerobias mesófilas por día de del ciclo, sala y altura. | 34 |
| Tabla 9. Porcentaje de placas positivas de <i>Salmonella</i> , error estándar de la media (EEM) y p-valor por día del ciclo, sala y altura. | 36 |
| Tabla 10. Recuento de bacterias aerobias mesófilas (logUFC/m ³) obtenidos mediante impactación en cascada según rango de tamaño de partículas a lo largo del ciclo en ambas salas | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fotomicrografía de microscopio electrónico de barrido de material particulado en alojamientos de broilers, mostrando partículas de distintos orígenes, formas y tamaños. Escala 100 micras. Círculos oscuros de 5 micras pertenecen a poros del filtro. Fuente: Cambra-López et al. (2010b)..... | 2 |
| Figura 2. <i>Salmonella</i> spp. Fuente: Austin <i>et al.</i> (1998), y colonias rosas de <i>Salmonella</i> spp. en medio selectivo Verde Brillante. | 10 |
| Figura 3. Vista de la nave experimental de cebo aviar del Centro de Investigación y Tecnología Animal y plano de dimensiones de las salas. | 13 |
| Figura 4. Imagen del ventilador situado en el techo de una de las naves..... | 13 |
| Figura 5. Placas expuestas en diferentes alturas de las salas y detalle de los medios de cultivos empleado y su colocación en bandejas..... | 17 |
| Figura 6. Detalle de borboteadores de aire suspendidos a una altura de 1,5 metros en el punto de muestreo en una de las salas..... | 18 |
| Figura 7. Impactador en cascada de seis niveles y bomba asociada muestreando aire y esquema del impactador en cascada..... | 20 |
| Figura 8. Imagen del impactador virtual en cascada para registro de material particulado y esquema de su funcionamiento | 23 |
| Figura 9. Equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM)..... | 24 |
| Figura 10. Croquis de una sala con la distribución de los equipos utilizados..... | 27 |
| Figura 11. Temperatura (T ^a) y humedad relativa (HR) durante el ciclo de producción en la sala 1. | 29 |
| Figura 12. Temperatura (T ^a) y humedad relativa (HR) durante el ciclo de producción en la sala 2. | 29 |
| Figura 13. Temperatura (T ^a) y humedad relativa (HR) durante el ciclo de producción en el exterior..... | 30 |
| Figura 14. Tasa de ventilación (m ³ /h/animal) durante el ciclo en la sala 1 y la sala 2. 30 | |
| Figura 15. Recuento de <i>Salmonella</i> en cama (log UFC/g de cama) a lo largo del ciclo en ambas salas..... | 32 |
| Figura 16. Materia seca (MS en porcentaje) de la viruta de la cama a lo largo del ciclo en ambas salas..... | 33 |

Figura 18. Imagen de suciedad acumulada durante las 24 horas del muestreo en una placa de sedimentación mostrando partículas de suciedad visibles (a) e imagen del crecimiento de *Salmonella* (manchas rosas) y coliformes (color amarillo) en un medio selectivo para *Salmonella* (b)..... 35

Figura 19. Recuento de bacterias aerobias mesófilas de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire a lo largo del ciclo en ambas salas 37

Figura 20. Gráfica de las concentraciones de PM_{2,5} (a), PM₁₀ (b) y TSP (c) medidas con el impactador virtual a lo largo del ciclo en ambas salas. 43

Figura 21. Evolución de PM_{2,5} y PM₁₀ durante 24 horas registrados con el equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM). 44

Figura 22. Concentración de PM_{2,5} medido con el equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM) en las dos salas a lo largo del ciclo..... 45

Figura 23. Concentración de PM₁₀ medido con el equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM) en las dos salas a lo largo del ciclo..... 46

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL MATERIAL PARTICULADO Y LOS MICROORGANISMOS EN EL AIRE DE EXPLOTACIONES GANADERAS: LOS BIOAEROSOLES

El aire en los alojamientos ganaderos está compuesto por numerosas sustancias contaminantes entre las que destacan gases como el amoníaco, el óxido nítrico, el metano, el dióxido de carbono y el sulfuro de hidrógeno además de grandes cantidades de material particulado (del inglés, Particulate Matter; PM) y microorganismos. El material particulado y los microorganismos en el aire son dos de los principales contaminantes en el ámbito de la ganadería. Estos compuestos se generan en el interior de los alojamientos y pueden ser emitidos en cantidades considerables al medio ambiente (Seedorf, 2004). Así, su importancia radica en su efecto perjudicial en el interior y exterior de los alojamientos, tanto para la salud humana como animal (Clark *et al.*, 1983; Douwes *et al.*, 2003).

El PM en alojamientos ganaderos se compone principalmente de partículas fecales, pienso, partículas de piel, pelo, y polvo mineral en diferentes proporciones (Cambra-López *et al.*, 2010c). Estas partículas pueden ir solas o asociadas a numerosos microorganismos, en ocasiones patógenos, y facilitar su transmisión entre animales y entre humanos dentro de una explotación, ocasionando problemas sanitarios importantes (Chinivasagam *et al.*, 2009). La presencia de microorganismos tales como bacterias, hongos y virus asociados al PM en alojamientos ganaderos ha sido confirmada por varios estudios en la literatura (Curtis *et al.*, 1975; Martin *et al.*, 1996; Andersson *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el nivel de PM en los alojamientos ganaderos y la concentración de microorganismos suspendidos en el aire (Bakutis *et al.*, 2004; Davis y Morishita, 2005). A esta asociación del PM con microorganismos o materiales con actividad biológica se denomina bioaerosol.

En alojamientos ganaderos la formación tanto de material particulado como de bioaerosoles, sus concentraciones y emisiones, depende de muchos factores físicos y biológicos, como son los factores relacionados con el sistema de alojamiento (tipo de alojamiento, sistemas de alimentación, sistema de gestión de estiércol), con el animal (especie, edad, número), y con los factores ambientales (temperatura y humedad) y el animal (especie, edad, número). En este sentido, la actividad de los animales, la

densidad y las condiciones de humedad son unos de los factores más influyentes (Takai *et al.*, 1998).

A continuación se explica detalladamente las características e implicaciones del material particulado y de los bioaerosoles en las explotaciones ganaderas.

1.1.1. Material particulado

Las denominadas partículas o PM del aire no son un único contaminante, sino una combinación de muchos contaminantes distintos. El término PM se refiere a una mezcla compleja de partículas en suspensión (**Figura 1**). La naturaleza heterogénea del PM incluye partículas de diferente origen, composición química, forma, tamaño y densidad que determinan tanto su comportamiento atmosférico, como sus efectos sobre la salud y el medio ambiente (EPA, 2004). Estas características del PM se describen a continuación.

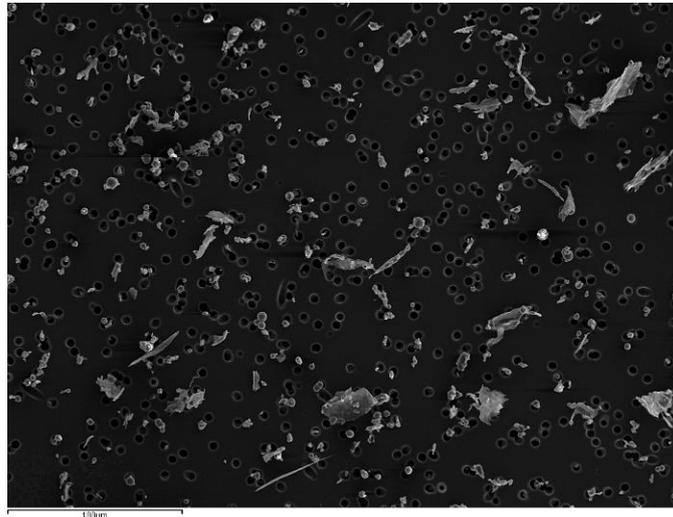


Figura 1. Fotomicrografía de microscopio electrónico de barrido de material particulado en alojamientos de broilers, mostrando partículas de distintos orígenes, formas y tamaños. Escala 100 micras. Círculos oscuros de 5 micras pertenecen a poros del filtro. Fuente: Cambra-López *et al.* (2010b).

En cuanto al origen, el PM en alojamientos ganaderos está básicamente compuesto por sustancias como partículas fecales, pienso, partículas de piel, pelo, y polvo mineral (Cambra-López *et al.*, 2010c). Las fuentes generadoras del PM varían de una especie animal a otra dependiendo del sistema de alojamiento. En aves, las fuentes generadoras del PM más importantes son las plumas, la yacija y los cristales de ácido úrico (Aarnink *et al.*, 1999), mientras que en porcino es el pienso (Heber *et al.*, 1988), la piel y el material fecal (Cambra-López *et al.*, 2010b).

En cuanto a la composición química, el PM procedente de los alojamientos ganaderos tiene una naturaleza fundamentalmente orgánica y consta de hasta un 90% de materia orgánica (Aarnink *et al.*, 1999; Seedorf y Hartung, 2001). La mayoría del PM está compuesto de elementos como el nitrógeno, sodio, magnesio, aluminio, silicio, azufre, cloro, potasio y calcio. Muchos de estos elementos son comunes a estructuras biológicas (plumas y piel), otros elementos como el aluminio y silicio son comunes en el polvo mineral (Cambra-López *et al.*, 2010c).

En cuanto a las características de forma, tamaño y densidad, el término científico “diámetro aerodinámico equivalente” (del inglés, aerodynamic diameter; AED) recoge estas tres propiedades en un solo parámetro. El AED se define como el diámetro de una partícula esférica con una densidad de 1 g/cm^3 que tendría la misma velocidad de sedimentación que la partícula en cuestión (Baron y Willeke, 1993). Partículas con un mismo AED tienen un comportamiento similar cuando se encuentran en suspensión en el aire. El AED es el término más habitual para describir el comportamiento de las partículas en la atmósfera o dentro del tracto respiratorio humano o animal. En la atmósfera, a menor AED mayor tiempo de permanencia en suspensión en el aire y por lo tanto mayor capacidad para ser transportada grandes distancias. En cuanto al tracto respiratorio, a menor tamaño de partícula mayor penetración en las vías respiratorias.

Existe una nomenclatura específica reconocida para el tamaño de las partículas que es PM_x, en la que x es el AED del umbral superior de las partículas en cuestión. Mediante esta notación, la PM puede clasificarse según diversas categorías de tamaño: PM_{2,5}, siendo partículas cuyo AED es menor ó igual que $2,5 \mu\text{m}$; y PM₁₀, siendo aquellas partículas cuyo AED es menor ó igual que $10 \mu\text{m}$. Son precisamente estas dos fracciones las que se regulan en las directivas europeas sobre calidad del aire: Directiva 1999/30/CE relativa a los valores límite de dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y óxidos de nitrógeno, partículas y plomo en el aire ambiente; y Directiva 2008/50 relativa a la calidad del aire ambiente.

El tamaño de las partículas en alojamientos ganaderos varía generalmente entre 2 y $18 \mu\text{m}$ y depende fundamentalmente de su origen mineral u orgánico. Las estructuras biológicas como por ejemplo la piel o el pelo tienen un mayor tamaño que otras partículas como por ejemplo las procedentes del pienso y las minerales suelen ser las de menor tamaño (Cambra-López *et al.*, 2010c).

1.1.2. Bioaerosoles

Los bioaerosoles constituyen uno de los agentes contaminantes más importantes producidos en los alojamientos ganaderos. Éstos se definen como aerosoles que comprenden partículas de origen o actividad biológica (esporas, hongos, virus, bacteria, toxinas y alérgenos) que puede afectar a seres humanos causándoles algún tipo de patología, ya sea de tipo alérgico, tóxico, infeccioso u otros (Hirst, 2005). Aunque los microorganismos pueden existir suspendidos libremente en el aire, éstos suelen estar unidos a partículas (Curtis *et al.*, 1975; White, 1993; Seedorf y Hartung, 2001).

El tamaño de los bioaerosoles varía generalmente entre 0,5 y 100 μm (Hirst, 2005). La principal fuente generadora de bioaerosoles en alojamientos ganaderos son los propios animales a través de sus propias secreciones y excreciones; además del pienso y la cama, en aquellas explotaciones en las que esté presente (Cox y Wathes, 1995).

Así, los bioaerosoles generados en el interior de las explotaciones ganaderas comprenden polvo orgánico (e.g. proteínas, polícarbohidratos), microorganismos (e.g. bacterias, hongos y virus) y componentes biológicos activos que se relacionan con reacciones tóxicas y procesos inflamatorios intensos (e.g. endotoxinas, glucanos).

Los microorganismos más comúnmente aislados en los alojamientos ganaderos son las bacterias Gram positivas, siendo *Staphylococcus* y *Streptococcus* los que predominan (Matkovic *et al.*, 2007). Algunas de estas bacterias han sido reconocidas como responsables de infecciones humanas (Gunn y Davis, 1988; Degener *et al.*, 1994; Razonable *et al.*, 2001).

Aunque las bacterias Gram negativas, como por ejemplo *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*, se han encontrado en menor porcentaje que las Gram positivas en el aire de alojamientos ganaderos (menos de un 10%), representan una cantidad elevada debido a la alta concentración de microorganismos totales y su importancia es mayor ya que son las que más frecuentemente se relacionan con problemas de salud.

También se han encontrado hongos en el aire de alojamientos ganaderos. Algunos hongos encontrados en explotaciones ganaderas son *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y *Cladosporium* sp. (Matkovic *et al.*, 2007).

La **Tabla 1** recoge niveles de concentraciones de microorganismos aerobios mesófilos cultivables, en el aire de varias granjas de diferentes especies animales, en diferentes

países y mediante diferentes sistemas de muestreo. El rango de concentraciones varía desde 10^3 UFC/m³ hasta 10^6 UFC/m³, siendo las más elevadas generalmente en alojamientos de broilers. Las técnicas habituales de muestreo de microorganismos del aire son: impactación sobre una superficie sólida o semi-sólida como el agar, borboteo en líquido y filtración (EN 13098:2001).

Tabla 1. Niveles de concentración de microorganismos aerobios mesófilos más comunes en aire en explotaciones ganaderas según especie y sistema de muestreo.

| Especie animal | Concentración microorganismos aerobios mesófilos (UFC/m ³) | Sistema de muestreo | País | Referencia |
|----------------|--|-------------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| Porcino | $1,17 \cdot 10^5$ | Impactación | Australia | Banhazi <i>et al.</i> (2005) |
| | $2,1 \cdot 10^5$ | Borboteador de aire | EEUU | Thorne <i>et al.</i> (1992) |
| | $3,3 \cdot 10^5$ | Borboteador de aire | Taiwan | Chang (2001) |
| | $3 \cdot 10^5$ | Impactación | Suecia | Clark <i>et al.</i> (1983) |
| | $1,2 \cdot 10^5$ | Muestreador automático de bacterias | Norte de Europa | Seedorf <i>et al.</i> (1998) |
| | $6,7 \cdot 10^4$ (fracción respirable) $1 \cdot 10^4$ (total) | Filtración e impactación | - | Predicala <i>et al.</i> (2001) |
| Broilers | $7,7 \cdot 10^6$ | Filtración | Alemania | Wiegand <i>et al.</i> (1993) |
| | $2,69 \cdot 10^3$ | Muestreador automático de bacterias | Norte de Europa | Seedorf <i>et al.</i> (1998) |
| | $53 \cdot 10^7$ | Impactación | Suiza | Oppliger (2008) |
| Gallinas | $4,2 \cdot 10^5$ | Impactación | Suecia | Clark <i>et al.</i> (1983) |
| | $3,16 \cdot 10^4$ | Muestreador automático de bacterias | Norte de Europa | Seedorf <i>et al.</i> (1998) |
| | $7,08 \cdot 10^3$ - $2,88 \cdot 10^4$ | Borboteador de aire | EEUU | Woodward <i>et al.</i> (2004) |

1.2. PROBLEMAS ASOCIADOS CON LOS BIOAEROSOLES

Tal y como se ha introducido con anterioridad, la inhalación de bioaerosoles constituye un riesgo importante para la salud, tanto para la salud del personal directamente relacionado con el cuidado de los animales en las explotaciones ganaderas (Seedorf y Hartung, 2001) como para la salud de los propios animales (Donham, 1991).

Existe numerosa información acerca de cómo afectan los bioaerosoles a la salud de los trabajadores y de los animales en régimen de explotación intensiva. A continuación se comentan los posibles problemas de la exposición a este tipo de contaminante.

1.2.1. Efectos sobre la salud humana

Se ha demostrado que los efectos perjudiciales asociados a la exposición a bioaerosoles dependen fundamentalmente del tipo de patógeno asociado y de las características del PM tales como el tamaño, la forma y la densidad de las partículas (AED), ya que, como se ha explicado anteriormente, estas características determinan el grado de penetración de las partículas en el tracto respiratorio.

Los problemas de salud más frecuentemente asociados a la exposición a bioaerosoles son los problemas respiratorios y las enfermedades infecciosas (Douwes *et al.*, 2003). A continuación se comentan estos dos tipos de enfermedades.

a. Enfermedades respiratorias

Las enfermedades respiratorias causadas por la inhalación de bioaerosoles pueden ir desde enfermedades subclínicas con síntomas poco evidentes hasta enfermedades respiratorias severas. Generalmente los síntomas encontrados son el resultado de la inflamación de las vías respiratorias causada por exposiciones a determinadas toxinas, agentes inflamatorios o alérgenos, o por las propias partículas en sí.

Aunque existe una amplia variedad de bioaerosoles en el aire de los alojamientos ganaderos uno de los problemas más relevantes es la inhalación de bacterias Gram negativas, en concreto partes de ellos como las endotoxinas (Zucker *et al.*, 2000; Just *et al.*, 2009). Las endotoxinas son complejos de lipopolisacáridos procedentes de la membrana de bacterias Gram negativas (Seedorf *et al.*, 1998), por ejemplo, de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*. Estudios epidemiológicos en ganado indican que la exposición a largo plazo a endotoxinas favorece el desarrollo de bronquitis crónica, deficiencia pulmonar (Rylander y Carvalheiro, 2006) y deterioro de la salud en general (Douwes *et al.*, 2003).

Además, Just *et al.* (2009) identificaron una mayor prevalencia de problemas respiratorios en los trabajadores de las granjas de aves en comparación con el resto de sistemas productivos, debido fundamentalmente a las mayores concentraciones tanto de bioaerosoles como de PM en estos alojamientos. Diversos trabajos han demostrado también que el PM es uno de los agentes que más enfermedades respiratorias provoca en animales como rinitis, inflamación de la tráquea, y enfermedades pulmonares (Homidan *et al.*, 2003; Done *et al.*, 2005).

b. Enfermedades infecciosas

La mayoría de virus, bacterias, hongos o protozoos tienen capacidad para provocar infecciones y la transmisión de estos agentes ya sea por inhalación o por contacto puede provocar serios problemas de salud. Los posibles riesgos de los bioaerosoles de origen ganadero en la salud humana incluyen las denominadas zoonosis. La **Tabla 2** recoge las principales zoonosis asociadas a bioaerosoles en alojamientos ganaderos.

Cuando los agentes patógenos son zoonóticos y transmisibles por el aire, pueden comprometer la salud de los ganaderos, así como la de las personas que viven en los alrededores de zonas de producción ganadera intensiva (Wathes *et al.*, 2004). Por ejemplo, existen virus como el virus de la fiebre aftosa que puede transmitirse por el aire a kilómetros de distancia de la propia granja fuente de la infección, infectando a los animales de granjas cercanas (Donaldson *et al.*, 1970; Hugh-Jones y Wright, 1970).

Tabla 2. Potenciales zoonosis transmitidas por el aire a través de bioaerosoles.

| Zoonosis | Microorganismo | Referencia |
|-------------------------|-------------------------------|--|
| Campilobacteriosis | <i>Campilobacter spp.</i> | Berrang <i>et al.</i> (2004) Wilson (2004) |
| Influenza | Virus gripe aviar | Power (2005) |
| Enfermedad de Newcastle | Virus enfermedad de Newcastle | Hugh-Jones <i>et al.</i> (1973) |
| Colibacilosis | <i>Escherichia coli</i> | Sauter <i>et al.</i> (1981) Zucker <i>et al.</i> (2000) |
| Salmonelosis | <i>Salmonella spp.</i> | Gast <i>et al.</i> (2004) |
| Fiebre aftosa | Virus género Aphthovirus | Ryan <i>et al.</i> (2007) |

Fuente: Cambra-López *et al.* (2010a)

1.2.2. Efectos sobre los animales

La exposición aguda y crónica de los animales a los bioaerosoles adheridos a partículas puede ocasionar además de afecciones y enfermedades respiratorias anteriormente señaladas, una disminución en el rendimiento productivo (Donham, 1991; Hayes *et al.*, 2000), (Wathes *et al.*, 2002).

Por ejemplo, Donham (1991) asoció una disminución en la eficiencia de conversión del pienso en cerdos con una alta concentración de microorganismos en el ambiente. Igualmente, Wathes *et al.* (2002) observaron una disminución del peso y de la ingestión de pienso en lechones cuando estos fueron expuestos a ambientes más cargados de material particulado en comparación con exposiciones a ambientes menos cargados. En gallinas, Guarino *et al.* (1999) identificaron una relación directa entre concentraciones de PM y la mortalidad. En el trabajo de Donham y Leininger (1984), los resultados de las necropsias llevadas a cabo en conejos y cerdos expuestos a ambientes altamente contaminados mostraron lesiones pulmonares, nasales y traqueales importantes. Adicionalmente se sabe que las lesiones en la tráquea provocan un empeoramiento de los mecanismos de defensa, haciendo a los pulmones más vulnerables a bioaerosoles, gases o partículas. Por lo tanto, el aire en el interior de los alojamientos ganaderos puede afectar no sólo a la salud y bienestar de los animales, sino también a los rendimientos productivos y consecuentemente se convierte en una cuestión con importancia económica.

1.3. FACTORES RELACIONADOS CON LA PRESENCIA Y SUPERVIVENCIA DE MICROORGANISMOS EN EL AIRE

Bajo condiciones favorables, los microorganismos transportados por el aire en el interior de los alojamientos ganaderos pueden crecer y propagarse en diferentes materiales y superficies (Zhu *et al.*, 2003). Así, los componentes sólidos del PM actúan como vector de transmisión de los microorganismos (Pedersen *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que las partículas pueden actuar como sustrato para los microorganismos ya que proveen un ambiente adecuado para su supervivencia (Aarnink y Ellen, 2007). Generalmente los microorganismos pueden tolerar un amplio rango de condiciones ambientales, aunque su supervivencia dependerá de su microambiente y de las propiedades del material al cual vaya unido (White, 1993).

La forma y el tamaño del PM determinan el periodo de supervivencia de los microorganismos en el aire. El tamaño de partícula, determina por un lado, cuánto tiempo la partícula permanece suspendida en el aire (Cox y Wathes, 1995) y por otro

lado, se relaciona con el número de células bacterianas que transporta de manera que, a menor tamaño permanecerá más tiempo suspendida y a mayor tamaño más bacterias contendrá cada partícula. Además, como se ha explicado anteriormente, el tamaño también determina el lugar del tracto respiratorio en el que se depositará una vez haya sido inhalada.

Las partículas pueden proteger a los microorganismos de condiciones climáticas adversas como por ejemplo la temperatura, la humedad relativa y la radiación ultravioleta (Cox y Wathes, 1995), que pueden provocar su inactivación. Las variaciones y fluctuaciones de la humedad relativa y temperatura pueden cambiar la concentración de bioaerosoles y partículas transportados por el viento (Bateman *et al.*, 1962; Cox y Wathes, 1995). Se ha demostrado que a mayor humedad relativa ambiental puede disminuir la masa de partículas aerotransportadas (Adhikari *et al.*, 2005).

Debido a la complejidad de estos factores, el grado de supervivencia y viabilidad de los microorganismos transportados por el aire no ha sido suficientemente descrito aún. Sin embargo sí se conoce cierta información sobre la supervivencia en el aire de determinados tipos de microorganismos como hongos, virus y bacterias.

En cuanto a hongos y virus el factor que más influye en su supervivencia y viabilidad en el aire es la cantidad de agua de la que dispone el microorganismo para evitar la desecación de la membrana externa que quedaría expuesta a la acción de los factores ambientales (Cox y Wathes, 1995); siendo por lo tanto, la humedad relativa uno de los factores clave para la supervivencia de estos microorganismos en el aire.

En cuanto a las bacterias, su grado de supervivencia en el aire es variable, debido a su diversidad estructural y metabólica. En general, las bacterias Gram positivas son más resistentes que las Gram negativas ya que su pared celular es más gruesa. Por ejemplo, en aire seco algunas especies de *Bacillus* y *Clostridium* son capaces de sobrevivir más de 200 años, y otras como por ejemplo *Mycobacterium* un mes (Potts, 1994).

Se conoce relativamente poco acerca de la distancia de transmisión de estos microorganismos aerotransportados (Seedorf, 2007). Durante el tiempo que permanecen suspendidos en el aire, los bioaerosoles podrían ser transportados por la acción del viento a distancias que pueden variar desde unos pocos metros hasta varios kilómetros. Los diferentes efectos de dilución y mecanismos de deposición (p.ej. la sedimentación, el desecamiento, y la radiación) disminuyen la concentración exterior de bioaerosoles emitidos y su estabilidad durante el proceso de dispersión (Seedorf,

2007). Se han realizado algunos estudios en este sentido, Herber *et al.* (2001) encontró un número significativo de bacterias viables a 800 metros de distancia en la dirección del viento bajo condiciones favorables en una granja de broilers. Davis y Morishita (2005) aislaron *Salmonella spp.* y *E. coli.* a 12 metros de una explotación de gallinas ponedoras. Así, los alojamientos ganaderos se pueden considerar como una fuente generadora de bioaerosoles que afectan a la calidad del aire interior, pero que además pueden causar problemas al ser emitidos al exterior de los alojamientos y transportados por el aire.

1.4. PATÓGENOS EN GRANJAS DE BROILERS: SALMONELLA

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. *Salmonella spp.* son bacilos Gram negativos y su tamaño oscila entre 1 y 3 μm de longitud y entre 0,5 y 0,7 μm de ancho (**Figura 2**). Generalmente poseen flagelos peritricos que les dan movilidad. Son bacterias anaerobias facultativas no esporuladas. Su temperatura óptima de crecimiento es 37° C (Madigan *et al.*, 2004).

La *Salmonella spp.* tiene su hábitat normal en el intestino de personas y animales y es uno de los patógenos más importantes transmitidos por los alimentos. Generalmente la Salmonellosis en humanos se contrae por medio del consumo de alimentos de origen animal, sin embargo también puede contraerse por inhalación de la bacteria (WHO, 2010) y transmisión orofecal. La Salmonellosis en humanos provoca fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas e incluso vómitos (WHO, 2010).



Figura 2. *Salmonella spp.* Fuente: Austin *et al.*(1998), y colonias rosas de *Salmonella spp.* en medio selectivo Verde Brillante.

Está ampliamente reconocido que los alojamientos avícolas, especialmente los de broilers, son una fuente de patógenos humanos como la *Salmonella*. Ésta es eliminada por las heces de los pollos, que generalmente se infectan en la incubadora o en la granja, y se multiplica en el ambiente, donde es muy resistente. *Salmonella* es muy resistente en el ambiente gracias a la acción del biofilm (Austin *et al.*, 1998). Costerton *et al.* (1995) describieron un biofilm como "conjunto de comunidades bacterianas adheridas a superficies o interfases y embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas". Este biofilm puede proteger a las bacterias de *Salmonella* en el ambiente hasta cuatro semanas (Barker y Bloomfield, 2000) y su formación resulta esencial para la supervivencia de la bacteria en el ambiente.

En general, *Salmonella* se puede aislar de una gran variedad de fuentes dentro de una granja de broilers (a parte de los propios animales) tales como aire, cama e instalaciones (Mallinson *et al.*, 2000; Lever y Williams, 1996) y en varios momentos del ciclo productivo (Chinivasagam *et al.*, 2009; Saleh *et al.*, 2005). Las bacterias coliformes como *Enterobacteriaceae spp.* en el aire de granjas de broilers constituyen entre el 1 y 2% del recuento total de bacterias (Seedorf *et al.*, 1998).

A nivel del aire, a pesar de que se ha demostrado que el polvo transportado por el aire está implicado en la transferencia de este organismo (Martin *et al.*, 1996; Bakutis *et al.*, 2004; Adhikari *et al.*, 2005; Davis y Morishita, 2005), son pocos los estudios que cuantifican los niveles de *Salmonella* en el aire debido a su dificultad (Gast *et al.*, 2004; Wales *et al.*, 2006). Por ello, muchos estudios se limitan simplemente a detectar *Salmonella* (Davis y Morishita, 2005; Davies y Breslin, 2001) o se semicuantifica mediante la técnica del número más probable (Chinivasagam *et al.*, 2009; Wales *et al.*, 2006).

En este contexto, se plantean los objetivos de este trabajo.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Cuantificar la concentración de bacterias aerobias mesófilas en el aire de granjas de broilers y estudiar su distribución y evolución en el tiempo.
2. Detectar y cuantificar *Salmonella* en el ambiente de granjas de broilers previamente infectados experimentalmente con *Salmonella enteritidis* y estudiar su distribución y evolución en el tiempo.
3. Cuantificar la concentración de material particulado de distintos tamaños en el aire en granjas de broilers y estudiar su evolución el tiempo.
4. Evaluar la relación entre el tamaño de partícula y las bacterias aerobias mesófilas y *Salmonella* en el aire de granjas de broilers.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. INSTALACIONES Y ANIMALES

El estudio se llevó a cabo en dos salas piloto (sala 1 y sala 2) de la nave experimental de cebo aviar del Centro de Investigación y Tecnología Animal, situado en Segorbe (Castellón). Cada sala tenía unas dimensiones de 13 x 6 metros (**Figura 3**).



Figura 3. Vista de la nave experimental de cebo aviar del Centro de Investigación y Tecnología Animal y plano de dimensiones de las salas.

Cada sala cuenta con tres líneas de bebederos. La longitud de la línea de bebederos era de 11,5 metros, habiendo 37 bebederos por línea con una separación entre bebederos de 30 cm aproximadamente.

Las salas disponían de un mecanismo de ventilación forzada controlado mediante un sistema copilot (Copilot System®, Barcelona). La extracción de aire de las salas se realizó mediante dos ventiladores situados en el techo de cada sala (**Figura 4**). El sistema de refrigeración empleado fue el de refrigeración evaporativa, a partir de unos paneles humidificadores por donde se hace pasar el aire procedente del exterior.



Figura 4. Imagen del ventilador situado en el techo de una de las naves

Para la experiencia se utilizaron un total de 576 pollos macho (línea Hubbard) de un día de vida y $41,7 \pm 3,43$ g de peso. Los pollos de un día se dividieron de forma aleatoria en 48 corrales (24 corrales/sala; 12 animales/corral). Los corrales tenían una superficie de $1,3 \text{ m}^2$ y se utilizó viruta de madera como cama (de 10 cm de espesor). Los corrales disponían de comedero individual y los bebederos en línea antes descritos. El ciclo de crecimiento duró 42 días durante el cual los animales fueron alimentados con un pienso comercial.

3.2. PARÁMETROS PRODUCTIVOS

Los pollos se pesaron al inicio y al final del ciclo. El consumo de pienso se valoró por corral al final del ciclo productivo. Con estos datos se calculó el consumo medio diario de pienso (CMD), la ganancia media diaria de peso (GMD) y el índice de conversión (IC; kg pienso consumido/kg peso) de los animales. La mortalidad fue supervisada diariamente y se tuvo en cuenta para el cálculo de los parámetros productivos.

3.3. PARÁMETROS AMBIENTALES

Se registró la temperatura y la humedad relativa cada 5 minutos en 2 puntos diferentes en el interior de cada sala y en otros dos puntos en el exterior (6 puntos en total). Para ello se utilizaron sensores de temperatura y humedad relativa (HOBO H8-007-02, Onset Computer Crp, Pocasset, Mass; HOBO U12-O13 Onset Computer Crp, Pocasset, Mass, EEUU).

Además, se registró el caudal de ventilación en cada sala. Éste se calculó a partir de un balance de dióxido de carbono (CO_2) según la ecuación:

$$\text{Caudal ventilación (m}^3/\text{h)} = \frac{E_{\text{CO}_2}}{C_i - C_e}$$

Siendo:

E_{CO_2} Emisión de dióxido de carbono (mg/h)

C_i Concentración interior de CO_2 (mg/m³)

C_e Concentración exterior de CO_2 (mg/m³)

La concentración interior y exterior de CO_2 se midió a partir de sondas con sensores de CO_2 (Vaisala GMT-222, 0-10,000 ppm), utilizando un datalogger (HOBO U12-O13 Onset Computer Crp, Pocasset, Mass, EEUU) para la recogida de datos. La concentración de CO_2 se registró cada 5 minutos. Para este cálculo, la emisión de CO_2

de los animales se estimó según valores obtenidos por Calvet *et al.* (2010) teniendo en cuenta el factor de producción de calor de los pollos en función del peso y la producción de CO₂. De esta forma y aplicando la ecuación anterior, se obtuvo el caudal de ventilación cada 5 minutos.

3.4. INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y MUESTREO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Previo a la llegada de los animales, las instalaciones (suelo, corrales y pared), el agua de bebida, la viruta (cama) y el pienso fueron muestreados para comprobar la ausencia de *Salmonella*. El análisis de presencia/ausencia de *Salmonella* se realizó de acuerdo a la ISO 6579:2002 según se describe en el anexo A.

El día 7 tras la llegada de los animales (día 8 del ciclo), éstos fueron infectados experimentalmente con *Salmonella enteritidis* Kanamicina resistente (número de cepa de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): 3934Ayhjt-km). Para ello se preparó una solución 10⁸ de *Salmonella* de esta cepa y se administró 1 mL de la solución a cada animal vía oral mediante una pipeta automática.

Desde el comienzo de la experiencia y a lo largo del ciclo de crecimiento de los pollos, se realizaron muestreos para la detección y/o cuantificación de *Salmonella* cultivable en la cama, en el aire ambiente y en las superficies tal y como se explica en los epígrafes siguientes. Además, se realizaron muestreos para la cuantificación de bacterias aerobias mesófilas cultivables en el aire. Los muestreos se realizaron con una frecuencia semanal.

3.4.1. Muestras de cama

Para la cuantificación de *Salmonella* cultivable en la cama, se recogió semanalmente una muestra de cama por sala. El muestreo se realizó a una profundidad de 1 – 4 centímetros, en varios puntos de cada sala, tal y como describe Chinivasagam *et al.* (2009). La muestra se recogió de todos los corrales. La muestra se introdujo en bolsas lo suficientemente grandes para permitir homogeneizarla bien según indican Mallinson *et al.* (2000). La cuantificación de *Salmonella* en muestras de cama se realizó mediante la técnica de recuento en placa según se describe en el anexo B 1.

Además, las muestras de cama se analizaron para materia seca. Para ello, se desecaron 80 – 100 gramos de muestra de cada sala hasta peso constante en estufa

(104°C durante 24 horas) según explica (AOAC International, 2003). Este análisis se realizó por triplicado.

3.4.2. Muestras ambientales

La detección y cuantificación de *Salmonella* y bacterias aerobias mesófilas en el aire ambiente se realizó utilizando tres sistemas: sedimentación en placa (método pasivo); borboteador de aire e impactador en cascada (ambos, métodos inerciales).

La diferencia entre ellos radica en el método de captación de la muestra (con o sin aire forzado) además del diámetro de corte y por lo tanto, el tamaño de partícula muestreado. Mediante la sedimentación en placa se obtiene principalmente bioaerosoles adheridos a tamaños de partícula grande o conglomerados de partícula que se depositan sobre la placa con agar por gravedad. Los borboteadores captan, en un medio líquido mediante aspiración del aire, partículas superiores a 0,3 µm. El impactador en cascada recoge la muestra directamente en agar mediante aspiración del aire y tiene la ventaja de separar por tamaños de partículas desde un mínimo de 0,65 µm hasta un máximo de 7 µm, haciéndolo pasar por diferentes tamaños de poro.

Utilizar sistemas de muestreo distintos permitiría posteriormente evaluar la relación entre el tamaño de partícula y los microorganismos en el aire, así como superar las desventajas de algunos de estos sistemas en la recuperación y muestreo de microorganismos del aire.

3.4.2.1. Sedimentación en placa

Para estudiar la presencia y distribución en el aire tanto de *Salmonella* como de bacterias aerobias mesófilas, se colocaron en cada sala un total de 36 placas petri con un medio selectivo para *Salmonella* (BGA, del inglés Brilliant Green Agar) (Liofichem, TE, Italia) con 50 µg/mL de Kanamicina (Kanamycin sulphate, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), y 36 con un medio para aerobios mesófilos (PCA, del inglés Plate Count Agar) (Liofolchem, TE, Italia) en tres alturas diferentes (12 placas por altura y sala): de 10 a 30 cm del suelo (altura de respiración de los pollos, varía debido al crecimiento de los animales), a 150 cm del suelo (altura de respiración de personas) y a 200 cm del suelo (altura de la salida de la ventilación) (**Figura 5**).



Figura 5. Placas expuestas en diferentes alturas de las salas y detalle de los medios de cultivos empleado y su colocación en bandejas.

Semanalmente, las placas se colocaron abiertas durante tiempos variables para obtener un número de colonias entre 30 y 300 para su recuento. En el caso del medio selectivo para *Salmonella* las placas se dejaron expuestas durante 24 horas. En el caso del medio para bacterias aerobias mesófilas este tiempo varió entre 5 y 30 min según la semana del ciclo de engorde de los pollos (**Tabla 3**). Tras la exposición, las placas de BGA y PCA se incubaron directamente. Las condiciones de incubación fueron 37°C durante 24 horas para el medio BGA y 30°C durante 48 horas para el PCA. Tras la incubación, las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contadas.

Tabla 3. Tiempos de exposición de las placas a lo largo del ciclo de crecimiento de los pollos para *Salmonella* y bacterias aerobias mesófilas cultivables.

| Día del ciclo | Tiempo de muestreo | |
|---------------|--|---|
| | Medio selectivo para <i>Salmonella</i> (BGA) | Medio para bacterias aerobias mesófilas (PCA) |
| 3 | 24 horas | 30 min |
| 10 | – | – |
| 17 | 24 horas | 5 min |
| 24 | 24 horas | – |
| 31 | 24 horas | – |
| 38 | 24 horas | – |

A partir del día 17 del ciclo de producción, debido al elevado número de microorganismos en el aire, no se realizaron muestreos para bacterias aerobias mesófilas en PCA. Además, debido a la saturación de partículas y otros microorganismos en las placas de BGA no se pudo realizar recuento, sin embargo, sí se determinó la presencia de *Salmonella*. Para ello, se realizó tras la incubación, un

procedimiento de agotamiento a tres placas de BGA del día 31 del ciclo (para comprobar que era efectivo) y al total de placas de BGA del día 38. El procedimiento de agotamiento consistía en sembrar parte de la muestra recogida en placas con medio de cultivo BGA en otra placa con un medio de cultivo XLT4 (Difco, Le Pont de Claix, Francia), también selectivo para *Salmonella*, mediante triple estría para obtener colonias aisladas. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las placas en las que crecieron colonias aisladas sospechosas de *Salmonella* en este medio se les realizaron diferentes pruebas bioquímicas para su confirmación: MUCAPTEST, prueba de la urea y test API (API-20, bioMerieux, Madrid, España).

3.4.2.2. Borboteadores de aire

Los microorganismos en el aire se muestrearon en medio líquido utilizando un sistema de frascos borboteadores “impingers” (AGI-30, Ace Glass, Inc., Vineland, NJ, EEUU) que funcionan recogiendo un volumen de aire conocido en un medio de captación líquido. El medio de captación utilizado estaba compuesto por 20 mL de agua de peptona tamponada estéril, 0,01% de Tween y 0,005% de antiespumante. El muestreo se hizo por triplicado en cada sala (3 impingers/sala). El caudal de aire muestreado fue 12,5 L/min por 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 . Todos los microorganismos por encima de este diámetro fueron recogidos.



Figura 6. Detalle de borboteadores de aire suspendidos a una altura de 1,5 metros en el punto de muestreo en una de las salas.

El muestreo se llevó a cabo en el centro de cada sala en un punto próximo a la salida del aire, a 1,5 m de altura (**Figura 6**). Las muestras de aire se recogieron semanalmente en cada sala durante un tiempo de 15 minutos. Con las tres muestras se hizo un pool de los triplicados de cada sala en un bote estéril, obteniendo una única

muestra por sala (60 mL), que se mantuvo refrigerada (4°C) para su transporte hasta el laboratorio.

La muestra se procesó en el laboratorio antes de 2 horas. La solución líquida se sembró en placa según se describe en el anexo B 1 para recuento de *Salmonella* y aerobios mesófilos.

El número de unidades formadoras de colonias se calculó en relación al volumen de aire muestreado, el tiempo de muestreo y el flujo de aire, tal y como muestra la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{m}^3} = \frac{\text{UFC} \times \text{V.muestra} \times 1000}{\text{V.sembrado} \times \text{Flujo aire} \times t}$$

Siendo:

UFC Unidades formadoras de colonias contadas en la placa

V. muestra Volumen de la muestra (20 mL)

V. sembrado Cantidad de muestra sembrado en placa (0,1 mL)

Flujo aire Flujo de aspiración de la bomba (12,5 L/min)

t Tiempo de muestreo (15 min)

Debido a la dificultad de cuantificar *Salmonella* en el aire directamente en placa, se llevó a cabo además la técnica semicuantitativa del número más probable (NMP) (anexo B 2). También se analizó la muestra de las tres últimas semanas del ciclo (semana 4, 5 y 6) para presencia de *Salmonella*. El análisis de presencia de *Salmonella* se realizó de acuerdo a la ISO 6579:2002 por el método de presencia/ausencia según se describe en el anexo A.

3.4.2.3. Impactación en cascada

Para muestrear microorganismos (aerobios mesófilos y *Salmonella*) en el aire en función del tamaño de partícula al que podrían estar adheridas, se utilizó un impactador en cascada en agar (Six Stage Viable, Andersen Cascade Impactor, Thermo Scientific, EEUU). Este impactador separa las partículas de acuerdo a su diámetro aerodinámico en el aire en distintos niveles de captación (**Figura 7**). El caudal de aire muestreado fue 28,1 L/min que se obtenía mediante una bomba de succión de caudal constante calibrada.

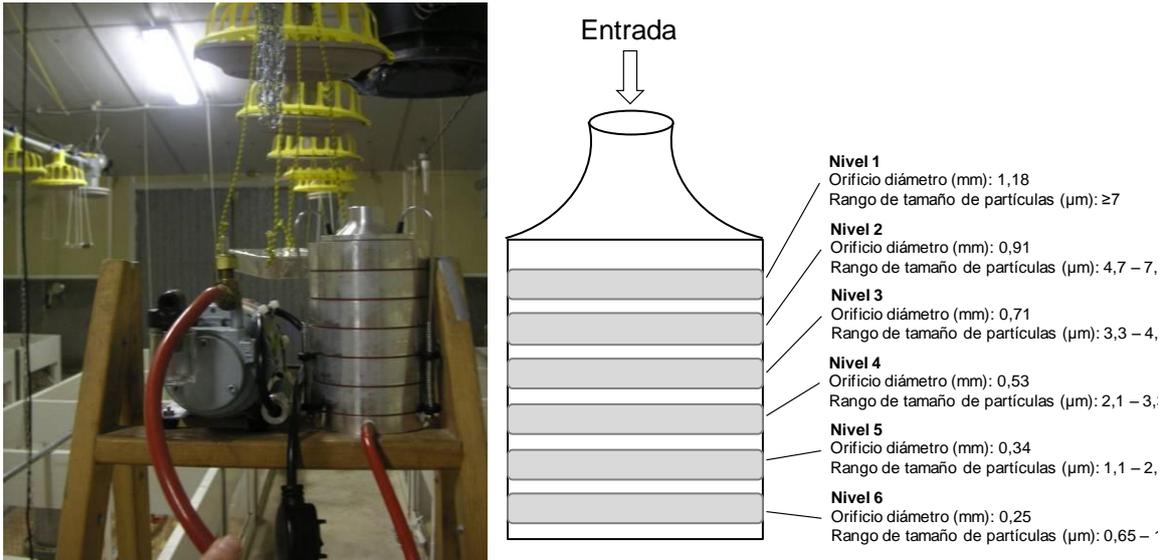


Figura 7. Impactador en cascada de seis niveles y bomba asociada muestreando aire y esquema del impactador en cascada

Este impactador consta de seis plataformas consecutivas perforadas con tamaños de poro decrecientes. Sobre cada una de las plataformas se colocó una placa de vidrio (DURAN Group GmbH, Alemania) con 27 mL de BGA con 50 µg/mL de Kanamicina (Kanamycin sulphate, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) para *Salmonella* y de la misma forma se colocaron 27 mL de PCA para bacterias aerobias mesófilas. El rango de diámetro de las partículas oscila entre 0,65 µm en el sexto nivel, hasta 7 µm ó superior en el primer nivel.

El muestreo se realizó semanalmente en cada sala. El tiempo de muestreo varió entre 10 y 90 segundos y fue ajustado para obtener un número de colonias entre 30 y 300 por placa según la semana del ciclo de crecimiento de los pollos (**Tabla 4**), así como para evitar la desecación del agar debido a la corriente de aire forzado que se hace pasar por las placas durante el muestreo.

Entre muestreos, el impactador se desinfectó con una solución de etanol al 70%. Las placas de agar se transportaron al laboratorio antes de haber transcurrido 2 horas desde el muestreo.

Tabla 4. Tiempo de muestreo semanal con el impactador en cascada a lo largo del ciclo de crecimiento de los pollos para detección de *Salmonella* y bacterias aerobias mesófilas cultivables.

| Día del ciclo | Tiempo de muestreo | |
|---------------|--|---|
| | Medio selectivo para <i>Salmonella</i> (BGA) | Medio para bacterias aerobias mesófilas (PCA) |
| 3 | 90 s | 90 s |
| 10 | – | – |
| 17 | 90 s | 30 s |
| 24 | 90 s | 10 s |
| 31 | 90 s | 10 s |
| 38 | 90 s | 10 s |

Después del muestreo estas placas se incubaron en estufa directamente. Las condiciones de incubación fueron 37°C durante 24 horas para el medio BGA y 30°C durante 48 horas para el PCA. Tras la incubación, las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contadas.

El número de unidades formadoras de colonias en el aire ambiente se calculó en relación al flujo de aire y el tiempo de muestreo para obtener las unidades formadoras de colonia por metro cúbico de aire muestreado, según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{m}^3} = \frac{\text{UFC} \times 1000}{\text{Flujo aire} \times t}$$

Siendo:

| | |
|------------|--|
| UFC | Unidades formadoras de colonias contadas en la placa |
| Flujo aire | Flujo de aire absorbido (28,1 L/min) |
| t | tiempo de muestreo (min) |

A partir del día 31 del ciclo, debido al elevado número de microorganismos en el aire en la explotación, las placas de PCA fueron lavadas para diluir la concentración de colonias según la metodología propuesta por Zhao *et al.*(2009). El lavado se realizó añadiendo 2 mL de agua de peptona estéril a cada una de las placas y mediante un asa de siembra se rascó la superficie del agar, sin dañarlo. Los 2 mL de agua de peptona se vertieron en un frasco estéril. Esta operación se repitió tres veces, obteniendo un total de 6 mL por placa. A partir de esta solución, el recuento de las colonias se realizó tal y como se describe en el anexo B 1.

Para estas placas y de la misma forma que para las placas sin lavado, el número de unidades formadoras de colonias en el aire ambiente se calculó en relación al flujo de aire y el tiempo de muestreo para obtener las unidades formadoras de colonia por metro cúbico de aire muestreado, según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{m}^3} = \frac{\text{UFC} \cdot 6}{0.1 \cdot \text{Flujo aire} \cdot t}$$

Siendo:

UFC Unidades formadoras de colonias contadas en la placa

Flujo aire Flujo de aire absorbido (28,1 L/min)

t tiempo de muestreo (min)

3.4.3. Muestras de superficies

Las superficies de las salas (paredes y corrales) se muestrearon utilizando toallitas húmedas estériles (AES laboratoire, Bruz Cedex, Francia) para detectar *Salmonella*. Las muestras se recogieron los días 23 y 37 del ciclo en 8 puntos distribuidos aleatoriamente dentro de cada sala. Posteriormente, se determinó la presencia de *Salmonella* en cada sala mediante la técnica de presencia/ausencia. El análisis de presencia de *Salmonella* se realizó de acuerdo a la ISO 6579:2002 por el método de presencia/ausencia según se describe en el anexo A.

3.5. MEDICIÓN DE MATERIAL PARTICULADO

El material particulado suspendido en el aire se registró semanalmente mediante dos sistemas: gravimetría y “tapped element oscillating microbalance” (TEOM). El material particulado se muestreó en función de su tamaño.

3.5.1. Gravimetría: acumulado 24 horas

Semanalmente se determinaron las concentraciones de tres fracciones de material particulado PM_{2,5}, 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). El impactador virtual (**Figura 8**) consta de tres niveles en los que separa las partículas de acuerdo a los distintos tamaños (material particulado de 2,5 µm de diámetro o inferior (PM_{2,5}); material particulado de 10 µm de diámetro o inferior (PM₁₀); y partículas totales (TSP). Se utilizó una bomba manual de succión (Genie VSS5, 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.

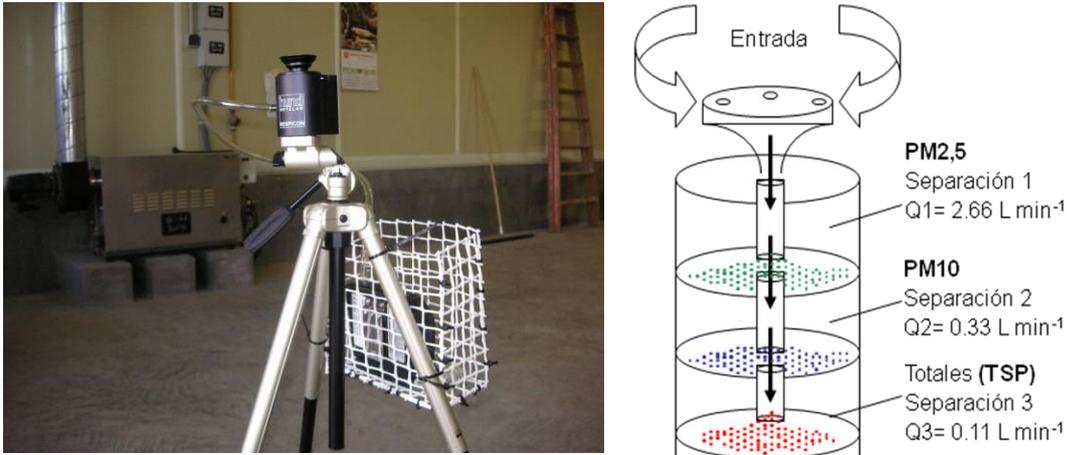


Figura 8. Imagen del impactador virtual en cascada para registro de material particulado y esquema de su funcionamiento

En cada nivel, 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 $10 \mu\text{g}$ de precisión (Metler Toledo MX5, España) de acuerdo con la norma (EN 12341:1999, 1999).

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

$$C_{\text{PM}_{2.5}} = \frac{m_1 \times 1000}{Q_1 \times t}$$

$$C_{\text{PM}_{10}} = \frac{(m_1 + m_2) \times 1000}{(Q_1 + Q_2) \times t}$$

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

Siendo:

C_{PM_i} 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 cerca de la salida del aire, a una altura de 1,5 metros de altura. El tiempo de muestreo fue de 24 horas por sala y semana.

3.5.2. Tapered element oscillating microbalance (TEOM): medición en continuo

Semanalmente, se registraron en continuo las concentraciones de PM₁₀ y PM_{2,5} con el sistema “Tapered element oscillating microbalance” (TEOM®, modelo 1405-D Thermo Fisher Scientific, EEUU) (**Figura 9**) en cada sala. El monitor mide masa de material particulado 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)



Figura 9. Equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM)

Las muestras de polvo se tomaron a 2 m de altura. En cada sala, el muestreo, de igual forma que las mediciones gravimétricas, fue semanal en ambas salas, comenzando en la primera semana (pre-infección) del ciclo. El equipo se programó para registrar concentraciones cada minuto. El tiempo de muestreo fue de 24 horas por sala y semana.

A modo de resumen, la **Tabla 5** recoge los diferentes muestreos y metodologías llevados a cabo durante el estudio y la **Figura 10** muestra la distribución de los equipos utilizados en las salas.

Tabla 5. Resumen del material y métodos empleados, frecuencia y tiempo de muestreo a lo largo del ciclo de crecimiento de los pollos.

| Parámetro | Descripción del parámetro | Análisis | Metodología muestreo | Fundamento muestreo | Tiempo de muestreo | Frecuencia muestreo | Metodología laboratorio |
|---------------------------------------|--|----------------------------|--|---|---------------------------|--|---------------------------------|
| Parámetros productivos | Consumo pienso Peso animales | - | - | - | - | Semanal | - |
| Parámetros ambientales | Temperatura Humedad relativa Ventilación | Cuantificación | Sensores | - | - | Continuo | - |
| Instalaciones, agua, cama, pienso | <i>Salmonella</i> | Detección | - | Recogida de muestra homogénea | - | Puntual (Antes de la llegada de los pollos) | P/A |
| Microorganismos en aire | <i>Salmonella</i> y aerobios mesófilos | Cuantificación | Sedimentación en placa | Captación pasiva en agar | 5 – 30 min PCA 24h BGA | Semanal | Recuento en placa |
| | | | Impactación en cascada | Captación inercial en placa según tamaño de partícula | 90 – 10 s | Semanal | Recuento en placa |
| Microorganismos en superficies | <i>Salmonella</i> | Cuantificación y detección | Borboteadores de aire | Captación inercial en medio líquido | 15 min | Semanal | Recuento en placa P/A NMP |
| Microorganismos en cama | <i>Salmonella</i> | Detección | Absorción en toallas húmedas estériles | - | - | Cada 15 días | P/A |
| Concentración de material particulado | - | Cuantificación | - | Recogida de muestra homogénea | - | - | Recuento en placa |
| | | | Impactación virtual en cascada | Gravimetría | 24 h | Semanal | Pesado filtros |
| | - | Cuantificación | Registro en continuo | TEOM | 24 h | Semanal | - |

P/A: Presencia/ausencia; NMP: Número más probable

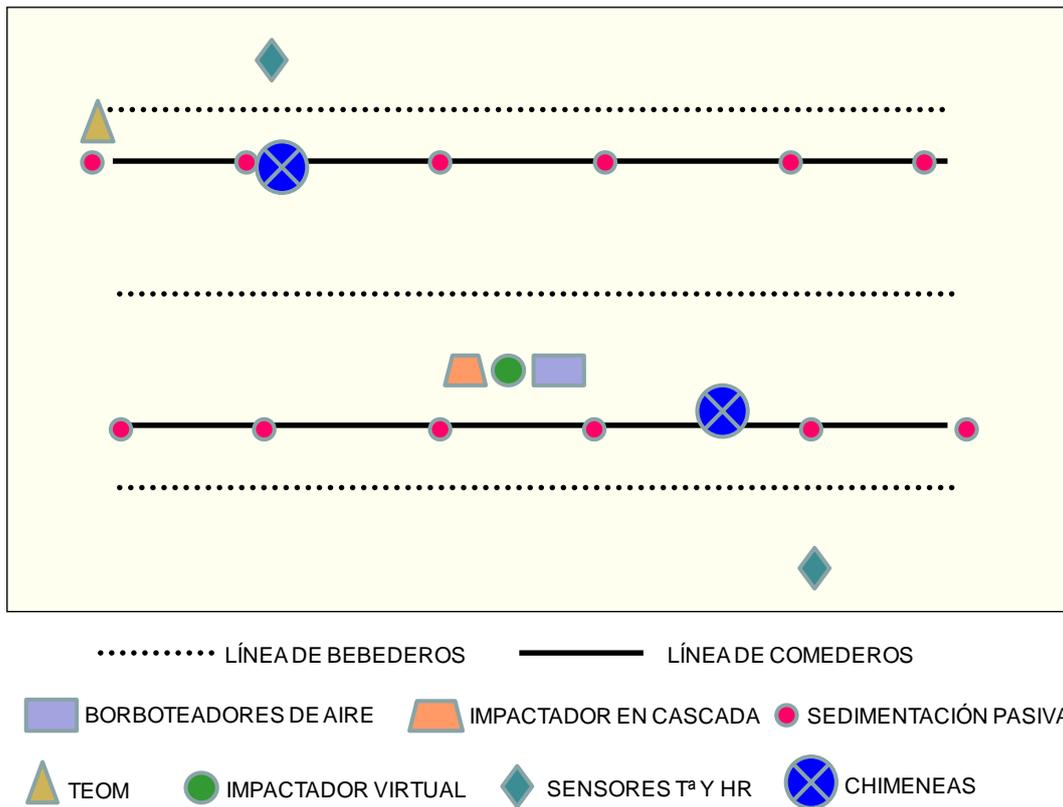


Figura 10. Croquis de una sala con la distribución de los equipos utilizados

3.6. ANALISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se analizaron por semana y sala. En la sección de resultados se ofrecen los valores medios de los datos. En el caso de los parámetros productivos y los recuentos de bacterias aerobias mesófilas y *Salmonella* obtenido mediante sedimentación en placa el elevado número de réplicas permitió realizar un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SAS System Software (Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, USA).

En el caso de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas y *Salmonella* los valores medios de recuento por alturas, salas y semanas fueron comparados mediante el test de comparación de medias tukey para un nivel de significación estadística del 5% (0,05).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PARÁMETROS PRODUCTIVOS

Los parámetros productivos de los animales se encontraron dentro de los rangos habituales en broilers. Los valores medios de consumo medio diario de pienso (CMD), ganancia media diaria (GMD) e índice de conversión (IC) durante todo el ciclo se presentan en la **Tabla 6** para cada sala. La GMD y el CMD fueron superiores en la sala 2 en comparación con la sala 1 ($p < 0.001$), aunque el IC medio no mostró diferencias significativas entre salas.

Tabla 6. Valores medios de consumo medio diario (CMD), ganancia media diaria (GMD) e índice de conversión (IC) durante todo el ciclo en las dos salas.

| | GMD (g/día) | CMD (g/día) | IC (g pienso/g peso) |
|---------|----------------|-------------|-------------------------|
| Sala 1 | 63,2 | 103,7 | 1,64 |
| Sala 2 | 67,6 | 110,5 | 1,63 |
| EEM | 0,60 | 0,78 | 0,008 |
| P-valor | <0,001 | <0,001 | 0,409 |

EEM: Error estándar de la media

4.2. PARÁMETROS AMBIENTALES

La temperatura y la humedad relativa en el interior de cada sala y en el exterior de la nave se presentan en la **Figura 11** (sala 1), **Figura 12** (sala 2) y **Figura 13** (exterior). En las dos salas la temperatura siguió un patrón similar, disminuyendo a lo largo del ciclo de producción atendiendo a las necesidades de los animales. En la **Figura 11** y **Figura 12** se observa por un lado, la disminución progresiva de la temperatura desde 30 – 32°C en el día 3 del ciclo hasta 24°C al final del ciclo. Por otro lado, se observa un incremento de la humedad relativa en las salas desde 25% en el día 3 del ciclo hasta 70% en el día 38 del ciclo. En el día 1 del ciclo se observó una bajada brusca de la temperatura debido al mal funcionamiento del sistema de calefacción, este problema se solucionó a partir del día 3. En el día 29 del ciclo, se observó un aumento brusco de humedad relativa en las dos salas coincidiendo con una bajada de temperatura, debido al incremento de la tasa de ventilación y la puesta en marcha del sistema de refrigeración con humedad “cooling”.

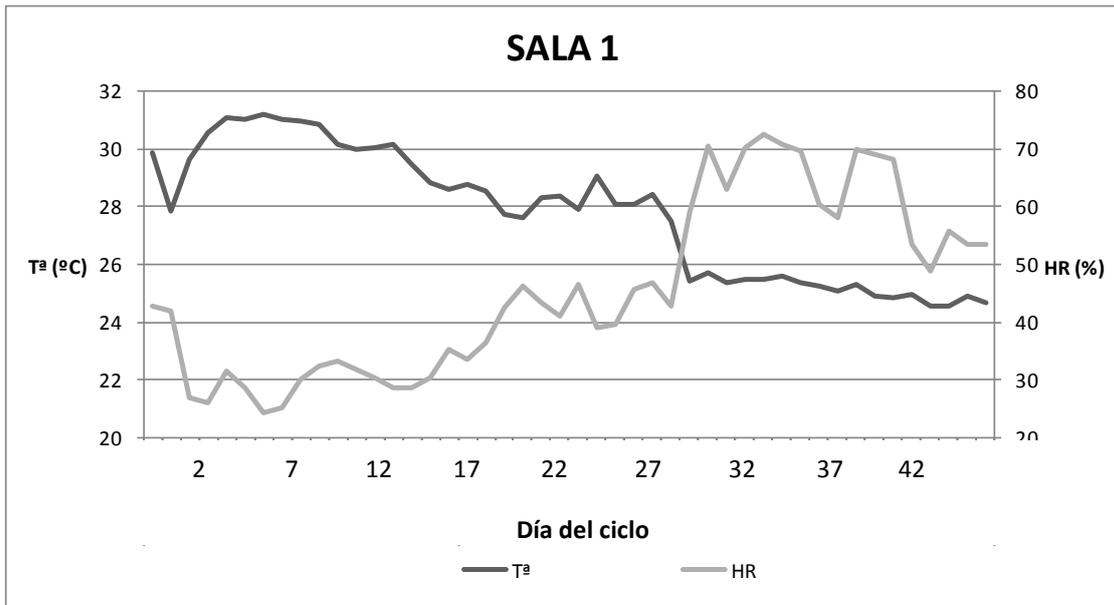


Figura 11. Temperatura (T^a) y humedad relativa (HR) durante el ciclo de producción en la sala 1.

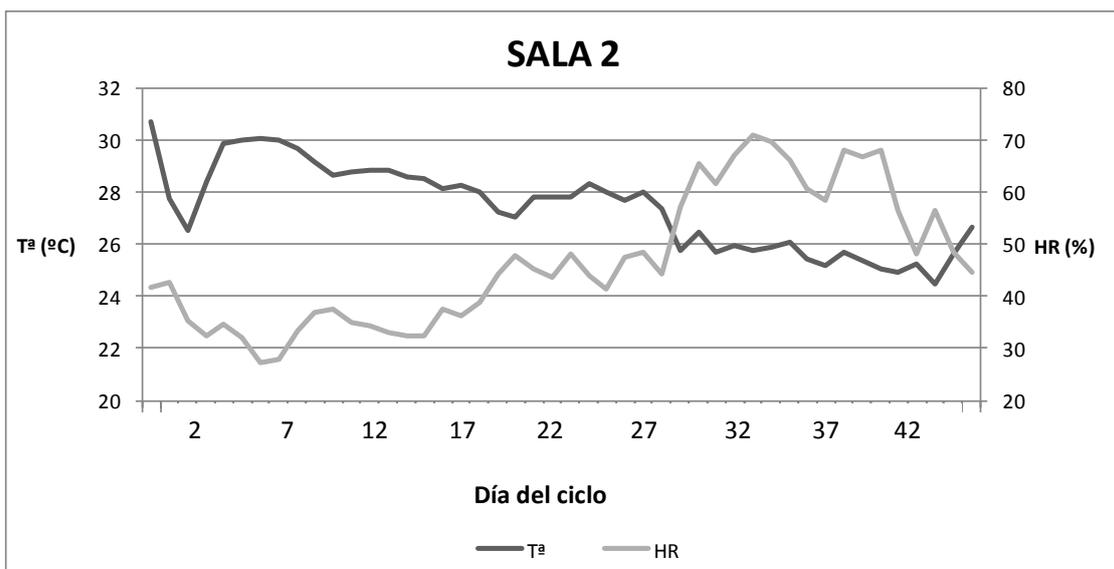


Figura 12. Temperatura (T^a) y humedad relativa (HR) durante el ciclo de producción en la sala 2.

La temperatura media exterior, varió entre 16°C y 28°C, siendo estas temperaturas propias de verano en el municipio de Segorbe, provincia de Castellón. La temperatura media exterior aumentó a lo largo del ciclo. Los días de máxima temperatura exterior coincidieron con los días de aumento de la tasa de ventilación y de puesta en marcha del “cooling” dentro de las salas. La humedad relativa exterior mostró variaciones a lo largo del ciclo, encontrándose entre 40 y 70%. Ésta aumentó hacia finales del ciclo

(día 27), afectando así la humedad interior de las salas que también aumentó hacia finales del ciclo de producción.

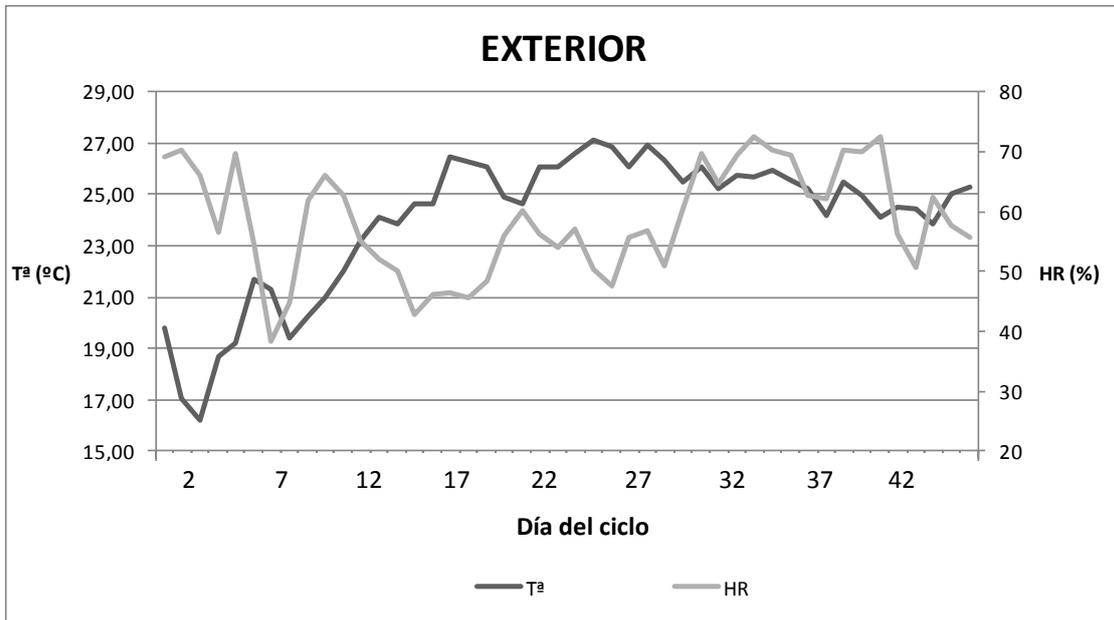


Figura 13. Temperatura (T^a) y humedad relativa (HR) durante el ciclo de producción en el exterior

En cuanto a la tasa de ventilación, la **Figura 14** muestra la evolución de ésta por animal a lo largo del ciclo de producción para las dos salas. La ventilación aumentó a lo largo del ciclo y varió desde 0,04 hasta 1,56 $\text{m}^3/\text{hora}/\text{animal}$ (sala 1) y desde 0,04 hasta 1,09 $\text{m}^3/\text{hora}/\text{animal}$ (sala 2). La tasa de ventilación por animal al comienzo del ciclo fue muy similar entre las salas. Después, a partir del día 10 del ciclo, la tasa media de ventilación en la sala 1 fue mayor que en la sala 2.

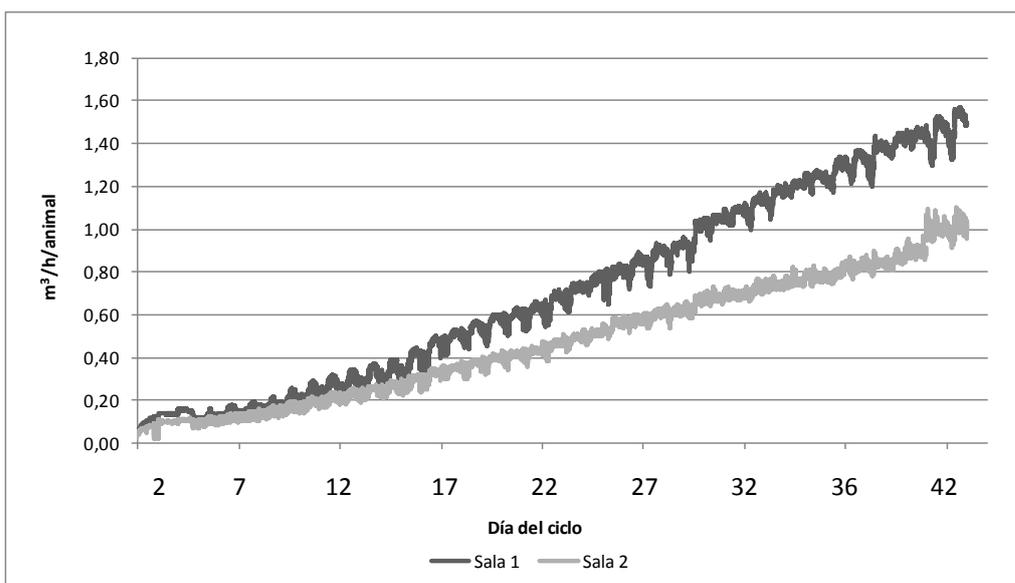


Figura 14. Tasa de ventilación ($\text{m}^3/\text{h}/\text{animal}$) durante el ciclo en la sala 1 y la sala 2.

La **Tabla 7** resume la ventilación media, la temperatura y la humedad relativa en las dos salas a lo largo del ciclo de producción.

Tabla 7. Media de la ventilación, temperatura, humedad relativa y desviación estándar a lo largo del ciclo de producción de las dos salas.

| | Día del ciclo | Ventilación (m ³ /h/animal) | Desvest Ventilación | T ^a (°C) | Desvest T ^a | HR (%) | Desvest HR |
|--------|---------------|--|---------------------|---------------------|------------------------|--------|------------|
| Sala 1 | 0–20 | 0,29 | 0,16 | 29,8 | 1,1 | 31,9 | 4,9 |
| | 20–42 | 1,07 | 0,27 | 26,5 | 1,3 | 56,6 | 11,3 |
| Sala 2 | 0–20 | 0,21 | 0,11 | 28,8 | 1,0 | 35,3 | 4,3 |
| | 20–42 | 0,70 | 0,16 | 26,5 | 1,1 | 56,7 | 10,3 |

En general, en los alojamientos ganaderos es fundamental mantener los parámetros ambientales de temperatura y humedad relativa, así como la ventilación, dentro de los rangos recomendados para satisfacer las necesidades de crecimiento de los animales. Además, los parámetros ambientales son importantes ya que pueden condicionar las concentraciones tanto de partículas como de bioaerosoles en el interior.

En este sentido, estudios previos han mostrado que temperaturas por debajo de 24°C parecen disminuir la supervivencia de algunas bacterias en el aire, entre ellas *Salmonella* (Tang, 2009). Los efectos de la humedad relativa del ambiente son más complejos. Estudios en bacterias Gram negativas, como *Salmonella*, han establecido un incremento de la mortalidad de estas bacterias con humedades relativas que oscilaban desde 50 – 70% a 70 – 90% (Tang, 2009). Asimismo, una tasa de ventilación inferior a 15,6 m/min puede aumentar el nivel de *Salmonella* en la cama; en este sentido, tasas de ventilación más bajas están asociadas a humedades relativas de la cama más elevadas.

4.3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Los análisis de presencia/ausencia previo a la llegada de los animales llevado a cabo en las instalaciones, el agua de bebida, el pienso y la viruta fueron negativos, asegurando así la ausencia total de *Salmonella* antes de la entrada de los animales y de la infección experimental.

4.3.1. Muestras de cama

En la **Figura 15** y **Figura 16** se presenta el recuento de *Salmonella* semanal y la materia seca de la viruta de la cama en cada una de las salas. El día 10 del ciclo se decidió no realizar muestreo debido a que la infección tuvo lugar durante esa semana (día 7 del ciclo) por lo que se asumió que la excreción de *Salmonella* en la cama todavía sería inexistente o casi nula.

La **Figura 15** muestra como las muestras de cama previas a la Infección experimental de los animales (día 3 del ciclo) fueron negativas para *Salmonella* en las dos salas. Tras la infección de los animales (día 7 del ciclo) la cama fue positiva para *Salmonella* durante todo el ciclo en ambas salas pero no se observó un patrón claro en los recuentos a lo largo del tiempo en ninguna de las dos salas. Se detectó *Salmonella* en cama en el orden de 2 – 3,5 logUFC/g (equivale a 10^2 – 10^3 UFC por gramo), siendo en general superior en la sala 1 que en la sala 2.

Existen escasos estudios en los que se hayan realizado recuentos de *Salmonella* en la cama en broilers bajo condiciones de infección experimental de los animales como en nuestro estudio. En condiciones comerciales, el recuento de *Salmonella* en cama de este estudio, fue similar al recuento de de Rezende *et al.* (2001), que obtuvieron 10^2 UFC/g, e inferior al recuento de Chinivasagam *et al.* (2009), que obtuvieron recuentos entre 10^3 – 10^5 expresados en número más probable por gramo.

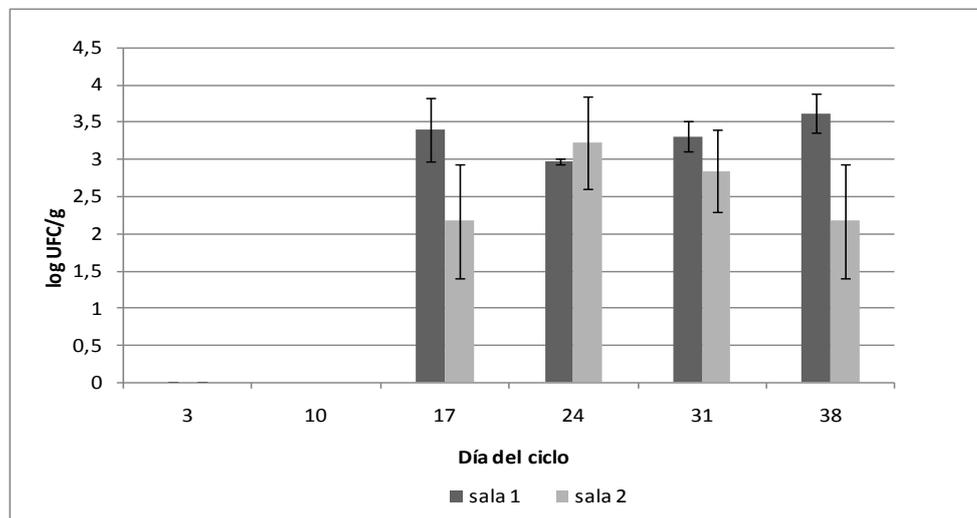


Figura 15. Recuento de *Salmonella* en cama (log UFC/g de cama) a lo largo del ciclo en ambas salas

En la **Figura 16** se observa semanalmente para las dos salas el contenido de materia seca de la cama. Tanto en la sala 1 y como en la sala 2 se observó una disminución de la materia seca y por lo tanto un incremento de humedad a lo largo del ciclo de

producción, variando desde 85% de materia seca en el día 3 del ciclo hasta 60% aproximadamente en el día 31 del ciclo; alcanzando cada semana valores similares en ambas salas.

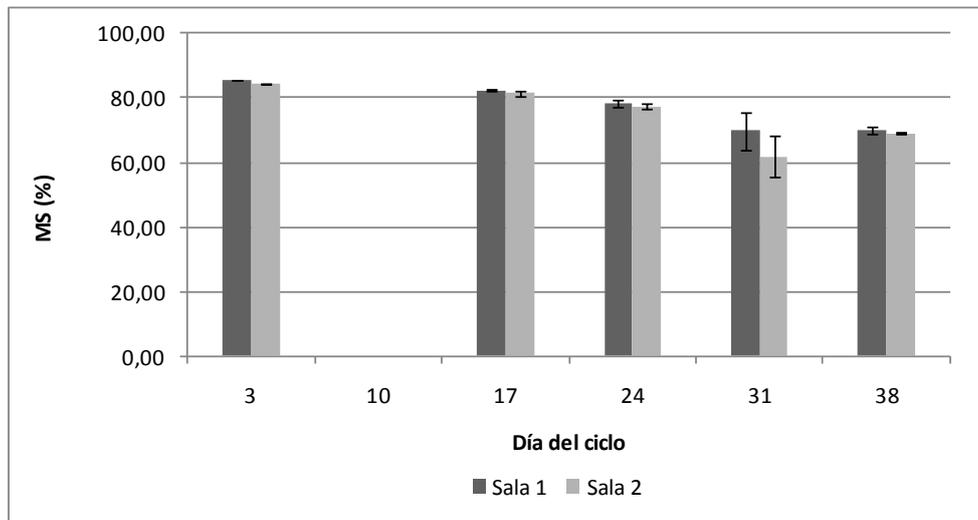


Figura 16. Materia seca (MS en porcentaje) de la viruta de la cama a lo largo del ciclo en ambas salas

La humedad de la cama aumenta a lo largo del ciclo de producción a medida que los animales crecen y aumenta la cantidad de deyecciones que se acumulan en la cama (Weaver y Meijerhof, 1991; Mitran *et al.*, 2008). Se ha demostrado en estudios previos que la actividad del agua y la humedad de la cama son parámetros críticos en el crecimiento de *Salmonella* en los alojamientos de broilers, relacionándose significativamente bajos niveles de humedad en la superficie de la cama con bajos niveles de contaminación de *Salmonella* (Mallinson *et al.*, 2000), (De Rezende *et al.*, 2001). de Rezende *et al.* (2001) encontraron un mayor recuento de *Salmonella* cuando la cama tenía entre un 35% y 50% de humedad que cuando la humedad se encontraba por encima o por debajo de este rango. En nuestro caso, la humedad de la cama alcanzó este rango (50 – 65% de MS) en las dos últimas semanas del ciclo (a partir del día 24 del ciclo). Sin embargo, los recuentos de *Salmonella* no fueron los máximos en este momento, sino cuando la humedad de la cama era todavía baja (20%). En este estudio, los recuentos máximos en la sala 1 se observaron 10 días post-infección y en la sala 2, 17 días post-infección. Probablemente esto se deba a que, en este estudio se realizó una infección experimental a altas dosis y, por tanto, cabe esperar una excreción máxima de *Salmonella* y recuentos máximos en cama mucho antes.

4.3.2. Muestras ambientales

4.3.2.1. Sedimentación en placa

Mediante la técnica de sedimentación en placa se estudió la distribución de los microorganismos a distintas alturas, tanto aerobios mesófilos como *Salmonella*, en ambas salas, estudiando 12 puntos de cada sala en tres alturas diferentes. Este sistema de muestreo pasivo recoge muestra de partículas más gruesas (e.g. partículas que rápidamente sedimentarían por acción de la gravedad)

En la **Tabla 8** se presenta para las bacterias aerobias mesófilas la media de los 12 puntos en cada una de las alturas muestreadas, por día de muestreo y sala. En general, la concentración bacteriana aumentó con el tiempo en ambas salas. Debido a una saturación excesiva de las placas que imposibilitaba el recuento de las bacterias aerobias mesófilas a partir del día 17 del ciclo, no se realizaron desde entonces muestreos de este tipo para aerobios mesófilos. Además, el recuento de bacterias aerobias mesófilas en las tres alturas fue homogéneo, por lo que a partir de este punto del ciclo no se esperaba encontrar diferencias entre las alturas.

Tabla 8. Media (logUFC), error estándar de la media (EEM) y p-valor del recuento de bacterias aerobias mesófilas por día de del ciclo, sala y altura.

| | Día del ciclo | Altura | N muestras | Log UFC/placa | EEM | P-VALOR |
|--------|---------------|--------|------------|---------------|-------|---------|
| Sala 1 | 3 | 30 cm | 12 | 3,02a | 0,038 | <0,001 |
| | | 150 cm | 12 | 2,56b | | |
| | | 200 cm | 12 | 2,17c | | |
| | 17 | 30 cm | 12 | 3,18 | 0,040 | 0,179 |
| | | 150 cm | 12 | 3,28 | | |
| | | 200 cm | 12 | 3,24 | | |
| Sala 2 | 3 | 30 cm | 12 | 2,54a | 0,029 | <0,001 |
| | | 150 cm | 12 | 2,21b | | |
| | | 200 cm | 12 | 2,29b | | |
| | 17 | 30 cm | 12 | 3,33 | 0,037 | 0,252 |
| | | 150 cm | 12 | 3,27 | | |
| | | 200 cm | 12 | 3,25 | | |

El muestreo realizado el día 3 del ciclo se observó un gradiente significativo de bacterias entre las tres alturas ($p < 0.001$), encontrándose un mayor número de bacterias aerobias mesófilas a la altura de los animales (a 30 cm) en ambas salas.

Esto es debido a que son éstos y sus deyecciones la principal fuente de microorganismos al aire (Seedorf *et al.*, 1998). Esta diferencia fue más notable en la sala 1. Sin embargo, dos semanas después (día 17 del ciclo), a parte de observar un incremento de la carga contaminante con respecto al muestreo anterior, ya no se observaron diferencias significativas en el recuento de bacterias aerobias mesófilas entre las tres alturas, indicando una distribución más homogénea de las bacterias aerobias mesófilas en el aire a partir de este momento.

El estudio de la distribución de la *Salmonella* en las salas mediante sedimentación en placa tampoco resultó fácil debido a la cantidad de suciedad que se acumuló durante las 24 horas de exposición en las placas y presumiblemente también por la competencia de la *Salmonella* con otras bacterias Gram negativas (p.ej. coliformes) en el medio de cultivo (**Figura 17**). Por este motivo sólo se muestran los resultados obtenidos durante los días 3, 24 y 38 del ciclo para *Salmonella*.

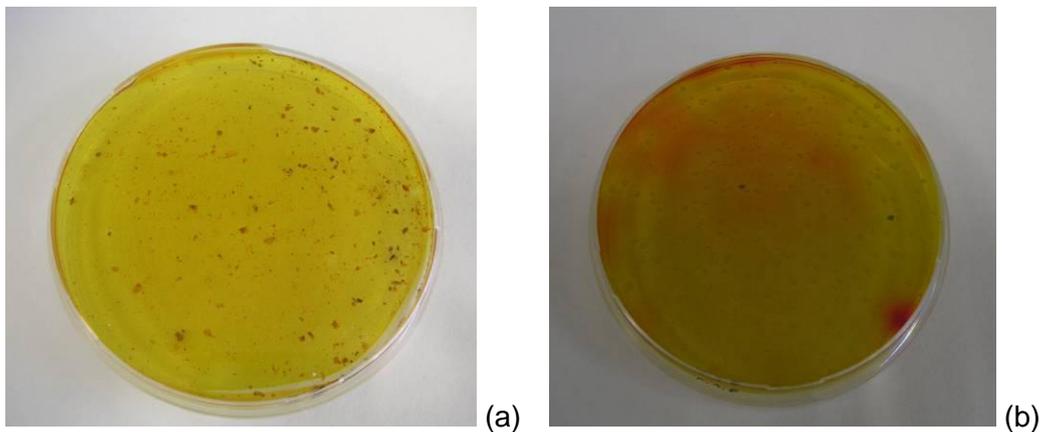


Figura 17. Imagen de suciedad acumulada durante las 24 horas del muestreo en una placa de sedimentación mostrando partículas de suciedad visibles (a) e imagen del crecimiento de *Salmonella* (manchas rosas) y coliformes (color amarillo) en un medio selectivo para *Salmonella* (b).

En la **Tabla 9** se presentan los resultados expresados como % de placas positivas a *Salmonella*, de las 12 placas utilizadas en cada una de las alturas muestreadas, por día de muestreo y sala. Durante las tres primeras semanas del ciclo de producción no se detectó presencia de *Salmonella* en ninguna de las placas. Ésta se detectó a partir del día 24 del ciclo en la sala 1 y día 38 en la sala 2. A pesar de que la excreción de *Salmonella* se detectó y cuantificó en la cama a partir del día 17 del ciclo, ésta no se detectó en el aire hasta una semana o dos después, según la sala, probablemente porque es necesario que las deyecciones se sequen, desagreguen y puedan suspenderse, para que las bacterias puedan encontrarse suspendidas en el aire.

La concentración de *Salmonella* aumentó a final del ciclo y la sala 2 presentó un porcentaje mayor (64%) de placas positivas que la sala 1 (11%). En las diferentes alturas de la sala 2 se obtuvieron porcentajes similares de placas con *Salmonella*, mientras que en la sala 1 la altura con mayor % de placas con *Salmonella* fue la altura 3, pero no se encontraron diferencias significativas entre alturas dentro de una misma sala ni entre salas

Tabla 9. Porcentaje de placas positivas de *Salmonella*, error estándar de la media (EEM) y p-valor por día del ciclo, sala y altura.

| | Día del ciclo | Altura | N muestras | Nº positivos (%) | EEM | P-VALOR |
|--------|---------------|--------|------------|------------------|-----|---------|
| Sala 1 | 3 | 30 cm | 12 | 0 | - | - |
| | | 150 cm | 12 | 0 | | |
| | | 200 cm | 12 | 0 | | |
| | 24 | 30 cm | 12 | 0 | - | - |
| | | 150 cm | 12 | 0 | | |
| | | 200 cm | 12 | 0 | | |
| | 38 | 30 cm | 12 | 1 (8,33%) | - | 0,140 |
| | | 150 cm | 12 | 0 | | |
| | | 200 cm | 12 | 3 (25%) | | |
| Sala 2 | 3 | 30 cm | 12 | 0 | - | - |
| | | 150 cm | 12 | 0 | | |
| | | 200 cm | 12 | 0 | | |
| | 24 | 30 cm | 12 | 0 | - | 0,140 |
| | | 150 cm | 12 | 3 (25%) | | |
| | | 200 cm | 12 | 1 (8,33%) | | |
| | 38 | 30 cm | 12 | 7 (58,33%) | - | 0,887 |
| | | 150 cm | 12 | 8 (66,67 %) | | |
| | | 200 cm | 12 | 8 (66,67%) | | |

EEM: Error estándar de la media

4.3.2.2. Borbotadores de aire

La **Figura 18** muestra el recuento de bacterias aerobias mesófilas obtenido utilizando la técnica de borbotadores de aire a lo largo del ciclo para cada sala. El promedio de concentración de UFC en el aire teniendo en cuenta las dos salas fue 6,28 logUFC/m³.

En ambas salas el comportamiento fue similar, hubo un incremento semanal en el número de UFC de bacterias aerobias mesófilas hasta alcanzar el máximo el día 24 del ciclo, en el que se obtuvo el máximo recuento de 7,48 log UFC/m³ en la sala 1 y de 7,36 log UFC/m³ en la sala 2 (ambos equivalen a 10⁷ UFC/m³). A partir de entonces los recuentos disminuyeron aunque los valores se mantuvieron elevados, entre 6,7 y 7 log UFC/m³.

La concentración de bacterias aerobias mesófilas en el aire y su evolución en el tiempo obtenida en este estudio fue superior a la concentración que obtuvieron Lever y Williams (1996), que fue aproximadamente de 4 logUFC/m³ el día 8 post infección con *Salmonella* en broilers (día 17 del ciclo), mientras que en este estudio fue para ese mismo día alrededor de 6 logUFC/m³. No obstante, en condiciones comerciales, la evolución del recuento de bacterias en el aire incrementa con la edad de los pollos (Oppliger, 2008), mostrando su concentración máxima alrededor de la cuarta semana del ciclo (Cox y Wathes, 1995), tal y como se muestra en nuestros resultados. Después, puede descender ligeramente debido a las elevadas tasas de ventilación que normalmente se alcanzan a finales del ciclo de producción de broilers. Además, los recuentos más elevados coinciden con humedades relativas del aire mayores, indicando una posible relación, tal y como han establecido otros autores, entre la mayor humedad ambiental y la supervivencia de microorganismos.

El recuento de bacterias aerobias mesófilas, aunque fue muy similar en ambas salas, fue en general ligeramente inferior en la sala 1 que en la sala 2. Esto podría ser debido a una mayor tasa de ventilación de la sala 1, que podría causar una disminución de la carga bacteriana en el aire de la sala.

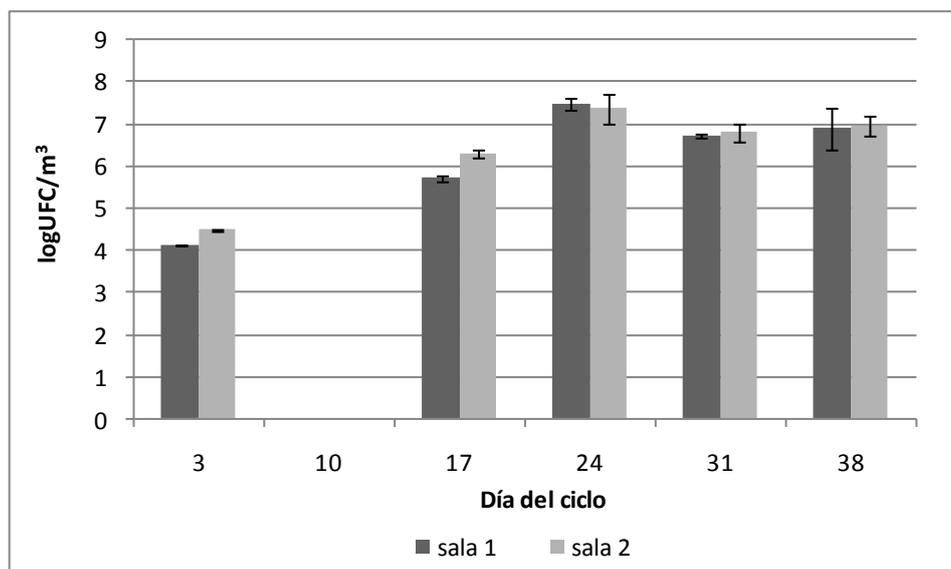


Figura 18. Recuento de bacterias aerobias mesófilas de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire a lo largo del ciclo en ambas salas

En cuanto al recuento de *Salmonella* en el aire, en las muestras recogidas mediante borboteadores de aire no se observó crecimiento de colonias en ningún momento del ciclo. No obstante, esto no significa que las bacterias de *Salmonella* no estuvieran presentes en el aire (como demuestran los resultados positivos obtenidos mediante sedimentación en placa), simplemente que no se detectó mediante esta técnica. El

hecho de que la muestra se recoja directamente en medio de cultivo (caso de las placas de sedimentación) y no haya ningún procesamiento posterior, como sería el caso de los borboteadores, donde se realizan cambios de frascos y diluciones de la muestra antes de ser sembrada en el medio de cultivo adecuado, podría explicar estas diferencias (Verreault *et al.*, 2008). Además, los puntos de muestreo con los borboteadores de aire fue uno, mientras que con la sedimentación en placa se muestrearon en cada una de las tres alturas 12 puntos.

Mediante la técnica del número más probable en este estudio, tampoco se observó crecimiento de *Salmonella*. El análisis de presencia/ausencia realizada en estas mismas muestras tampoco reveló presencia de *Salmonella*.

Además, cada una de las técnicas empleadas para la detección y cuantificación de microorganismos tiene un límite de detección distinto, siendo el más bajo (y más preciso) el de las placas de sedimentación. El límite de detección calculado para recuento de *Salmonella* en el aire mediante los borboteadores de aire, es de 3,03 logUFC/m³ (equivalente a 10³ UFC/m³), por lo que concentraciones inferiores a ésta no serían detectadas. Este límite se calcula suponiendo que se pueda contar una sola colonia en la placa, a partir del tiempo de muestreo y caudal de aire muestreado (Buttner y Stetzenbach, 1991).

El recuento de *Salmonella* es complicado por su baja concentración en el aire, por lo que diversos autores han recurrido a técnicas más sensibles para detección de *Salmonella* en el aire de los alojamientos ganaderos como son la técnica de presencia/ausencia o técnicas semicuantitativas como la técnica del NMP (Gast *et al.*, 2004; Davis y Morishita, 2005). En este estudio también se emplearon este tipo de técnicas pero tampoco fueron efectivas para detectar *Salmonella* en aire. En otros estudios, utilizando equipos diferentes de muestreo y un flujo de aire muestreado superior cuantificaron aproximadamente 10 UFC/m³, concentración por debajo del límite de detección de los borboteadores de aire (Lever y Williams, 1996) igualmente, sin embargo, Chinivasagam *et al.* (2009) contaban con un límite de detección de 5 UFC/m³.

4.3.2.3. Impactación en cascada

En la **Tabla 10** se observa el recuento de bacterias aerobias mesófilas a lo largo del ciclo, recogidas mediante la técnica de impactación en cascada.

Se presenta para cada sala el logaritmo de UFC obtenido en los 6 niveles del equipo de muestreo, correspondientes a los distintos tamaños de partículas. El promedio de concentración de UFC en el aire teniendo en cuenta las dos salas fue 7,11 logUFC/m³,

siendo ligeramente superior en la sala 2, coincidiendo con los resultados obtenidos mediante los borboteadores de aire.

En primer lugar, los resultados muestran un incremento semanal de microorganismos durante todo el ciclo para todos los tamaños en ambas salas, tal y como se observó en la evolución de bacterias aerobias mesófilas a lo largo del ciclo de producción con los borboteadores de aire y también en las placas pasivas. En segundo lugar, según los distintos tamaños de partículas, en la tabla se observa como, en general durante todo el ciclo de engorde, el recuento máximo de aerobios mesófilos se encuentra en los rangos de partículas mayores. Los mayores recuentos se obtuvieron entre 4,7 y 7 μm en la sala 1 y entre 3,3 y 4,7 μm en la sala 2. Estos resultados indican una mayor asociación de las bacterias aerobias mesófilas a las partículas de tamaños entre 3,3 y 7 μm o superior, comparado con las más pequeñas (entre 0,65 y 3,3 μm).

Tabla 10. Recuento de bacterias aerobias mesófilas (logUFC/m³) obtenidos mediante impactación en cascada según rango de tamaño de partículas a lo largo del ciclo en ambas salas

| Día del ciclo | Rango de tamaño de partículas (μm) | | | | | | Suma | |
|---------------|---|-------|---------|---------|---------|--------|------|------|
| | >7 | 4,7–7 | 3,3–4,7 | 2,1–3,3 | 1,1–2,1 | 0,65–1 | | |
| Sala 1 | 3 | 3,07 | 3,11 | 3,27 | 3,11 | 2,37 | 1,67 | 3,77 |
| | 10 | – | – | – | – | – | – | – |
| | 17 | 4,44 | 4,66 | 4,50 | 4,40 | 3,97 | 3,39 | 5,15 |
| | 24 | 5,33 | 5,37 | 5,15 | 5,07 | 4,95 | 4,79 | 5,93 |
| | 31 | 8,76 | 6,71 | 5,80 | 6,92 | 6,88 | 6,88 | 8,78 |
| | 38 | 7,41 | 6,41 | 6,71 | 7,22 | 6,89 | 6,60 | 7,79 |
| Sala 2 | 3 | 3,41 | 3,40 | 3,37 | 3,18 | 2,58 | 1,37 | 3,97 |
| | 10 | – | – | – | – | – | – | – |
| | 17 | 4,50 | 4,52 | 4,54 | 4,40 | 4,30 | 4,47 | 5,24 |
| | 24 | 5,46 | 5,34 | 5,71 | 5,45 | 5,45 | 5,10 | 6,23 |
| | 31 | 6,58 | 6,10 | 7,03 | 6,28 | 5,80 | 5,80 | 7,28 |
| | 38 | 7,22 | 6,64 | 6,62 | 6,53 | 6,27 | 7,74 | 7,93 |

En el caso de *Salmonella*, sólo se detectó de forma aislada mediante la técnica de impactación en cascada, al final del ciclo (días 24 y 38) en la sala 2 en los rangos de tamaños de partículas entre 0,65–1 μm , 3,3–4,7 μm y 7 μm o superior. De esto se deduce su presencia en el resto de tamaños de partícula. Estos resultados indican que la *Salmonella* puede transportarse adherida a diferentes sustratos con diferentes tamaños de partícula.

En este caso, el límite de detección del impactador en cascada para recuento de la *Salmonella* en el aire calculado suponiendo que se pueda contar una sólo colonia en la

placa, a partir del tiempo de muestreo y caudal de aire muestreado es 1,37 logUFC/m³ (equivale a 10¹ UFC/m³), muestreando 90 segundos. Esto no significa que no haya *Salmonella* en el aire, sino que nuestros resultados indican que la *Salmonella* se encontraba por debajo de este límite de detección en la mayoría de los casos.

En definitiva y en global, con respecto a la detección de *Salmonella* en el aire nuestros resultados indican que el rango de concentración de *Salmonella* podría encontrarse entre 10¹ y 10³ UFC/m³, ya que por un lado, con el impactador en cascada (con un límite de detección de 10¹) se detectó *Salmonella*, y por otro lado con el borboteador de aire, no se detectó *Salmonella* por encima de 10³, por lo que se podría afirmar que la concentración de *Salmonella* en el aire no es superior a 10³ UFC/m³.

La diferencia entre los resultados obtenidos con los borboteadores frente al impactador en cascada se debe al sistema de muestreo en sí, en un caso se da la impactación en un medio de cultivo frente a un medio líquido como ya se ha comentado anteriormente. El recuento medio de los borboteadores de aire fue de 6,28 logUFC/m³, mientras que con el impactador en cascada fue 7,11 logUFC/m³. Esto ocurre en parte por el daño que pueden sufrir las bacterias en el medio líquido durante el tiempo de muestreo, ya que otros estudios han descrito que pueden resultar dañadas hasta un 60% de las bacterias con un tiempo de muestreo de 15 minutos con los borboteadores (Terzieva *et al.*, 1996). Las células dañadas pueden presentar una pérdida de las funciones relacionadas con la membrana, que podría afectar a su habilidad para crecer en medios selectivos. Además, también se ha descrito una pérdida por vaporización de las partículas durante el muestreo debido al borboteo. No obstante, para minimizar al máximo estas pérdidas durante el muestreo mediante los borboteadores de aire, se utilizó una solución con suficiente agua de peptona tamponada (20 mL) a la que se le añadió un emulsificador (Tween) que mejora la captura de partículas no higroscópicas. Además, cada sistema de muestreo utiliza una selección por tamaño. Por eso, la eficiencia del borboteador de aire es mayor porque recoge un rango más amplio de tamaños, mientras que el impactador en cascada recoge partículas a partir de 0,65 µm, el borboteador recoge partículas a partir de 0,3 µm.

No obstante, la utilización de técnicas de recuento más sensibles como es la técnica molecular qPCR a tiempo real (quantitative Polymerase Chain Reaction), con límites de detección más bajos que pueden recuperar una sola célula de la alícuota analizada podría ser una alternativa útil para la detección de este tipo de microorganismos que en condiciones normales se encuentran en bajas concentraciones en el aire. La recuperación de una célula mediante el sistema de borboteadores de aire con un flujo de aire de 12,5 L/min y un tiempo de muestreo de 10 min, corresponde a un límite de

detección de 9 células por m³ de aire. En comparación con el impactador en cascada, la recuperación de una célula con un flujo de aire de 28,3 L/min y un tiempo de muestreo de 2 minutos corresponde a un límite de detección de 18 bacterias por m³ (Alvarez Abdiel, 1995).

Por ejemplo, Fallschissel (2009) detectó *Salmonella* en granjas de broilers comerciales, en el orden de 10² UFC/m³ utilizando métodos de cuantificación en placa de cultivo, mientras que en la misma muestra analizada por qPCR, se cuantificó 10⁵ UFC/m³.

Es importante destacar que, una característica común de todas estas técnicas de detección (a diferencia de la PCR) es que las bacterias que se detectan son siempre viables, capaces de crecer y reproducirse en un medio de cultivo y las realmente capaces de infectar a los humanos y a otros animales.

4.3.3. Muestras de superficies

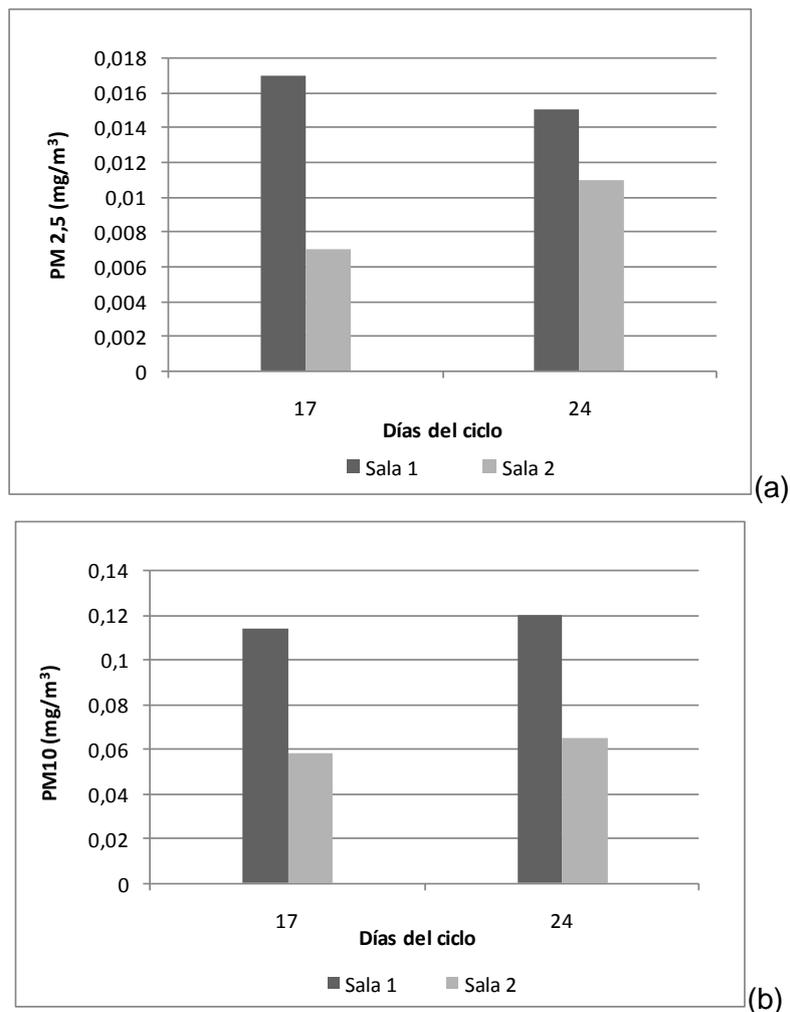
El muestreo de las superficies en las instalaciones de las salas para la detección de la *Salmonella* se llevó a cabo los días 24 y 38 del ciclo en cada sala. Los resultados fueron positivos para *Salmonella* en ambos días. Mediante este muestreo, se recoge el material particulado grueso, que es el que se deposita sobre la superficie por efecto de la gravedad sobre paredes, y otras superficies horizontales. Este tamaño de material particulado es el mismo que se recoge mediante la sedimentación en placa, con la diferencia que cae directamente en la placa con medio de cultivo selectivo para *Salmonella*. Sin embargo, mediante la sedimentación pasiva en placas no se obtuvieron resultados positivos el día 24 del ciclo en la sala 1, mientras que con el muestreo de las superficies sí que se detectó *Salmonella* en las instalaciones. Esto puede ser debido a que, por un lado, como se ha comentado anteriormente, la suciedad acumulada de las placas y la competencia con otras bacterias no deja crecer *Salmonella* y, por otro lado, porque el método empleado para analizar la muestra de las instalaciones basado en la ISO 6579:2002 es más sensible, ya que se realiza un pre-enriquecimiento de las muestras.

4.4. MEDICIÓN DE MATERIAL PARTICULADO

4.4.1. Gravimetría: acumulado 24 horas

Los resultados de la concentración de partículas en el aire, obtenidos mediante el impactador virtual en cascada RespiCon se presentan en la **Figura 19**. Se muestran únicamente los resultados de los días 17 y 24 del ciclo, el resto de días no se obtuvieron resultados fiables por problemas técnicos con el equipo de muestreo y la calibración de las bombas empleadas.

La concentración de partículas varió entre 0,007 y 0,017 mg/m³ para el PM_{2,5}, entre 0,065 y 0,114 mg/m³ para el PM₁₀ y entre 0,113 y 0,424 mg/m³ para el TSP durante los dos días de muestreo. Las concentraciones más altas se observaron en la fracción más gruesa (TSP) y en la sala 1. Las medias generales para ambas salas fueron 0,013 mg/m³ para PM_{2,5}, 0,089 mg/m³ para PM₁₀ y 0,220 mg/m³ para TSP. La concentración de partículas disminuyó semanalmente.



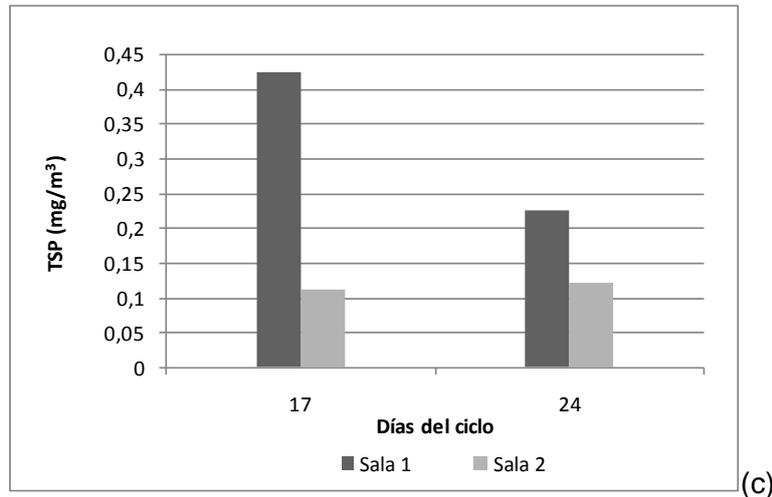


Figura 19. Gráfica de las concentraciones de PM_{2,5} (a), PM₁₀ (b) y TSP (c) medidas con el impactador virtual a lo largo del ciclo en ambas salas.

4.4.2. Tapered element oscillating microbalance (TEOM): medición en continuo

A continuación se muestra una gráfica por semana y sala de la concentración de partículas obtenida mediante el TEOM (medición en continuo) en un periodo de 24 horas para dos tamaños de partículas: PM_{2,5} y PM₁₀.

En el comportamiento de las concentraciones de partículas, tanto para el PM_{2,5} y el PM₁₀, se observa cierto patrón que se repite a lo largo del tiempo (**Figura 19**). En general se observa un aumento de la concentración de PM coincidiendo con el encendido de las luces: entre las 03:00 y las 04:00 h el día 10, entre las 05:00 y las 06:00 h el día 25 y entre las 06:00–07:00 h el día 39 del ciclo. Esta mayor concentración se mantuvo elevada durante toda la mañana, presentándose diferentes picos de concentración a diferentes horas según el día. Los máximos de concentración se registraron entre las 10:00 y 12:00; coincidiendo con las horas de mayor actividad en la granja. A última hora de la mañana, sobre las 12:00 – 14:00 h comenzaba a disminuir la concentración hasta alcanzar el mínimo durante la madrugada.

En todos casos la concentración del PM₁₀ fue superior a la concentración del PM_{2,5}, igual que con el impactador en cascada. La concentración media fue de 0,019 mg/m³ de PM_{2,5} y 0,189 mg/m³ de PM₁₀ para todo el ciclo y las dos salas.

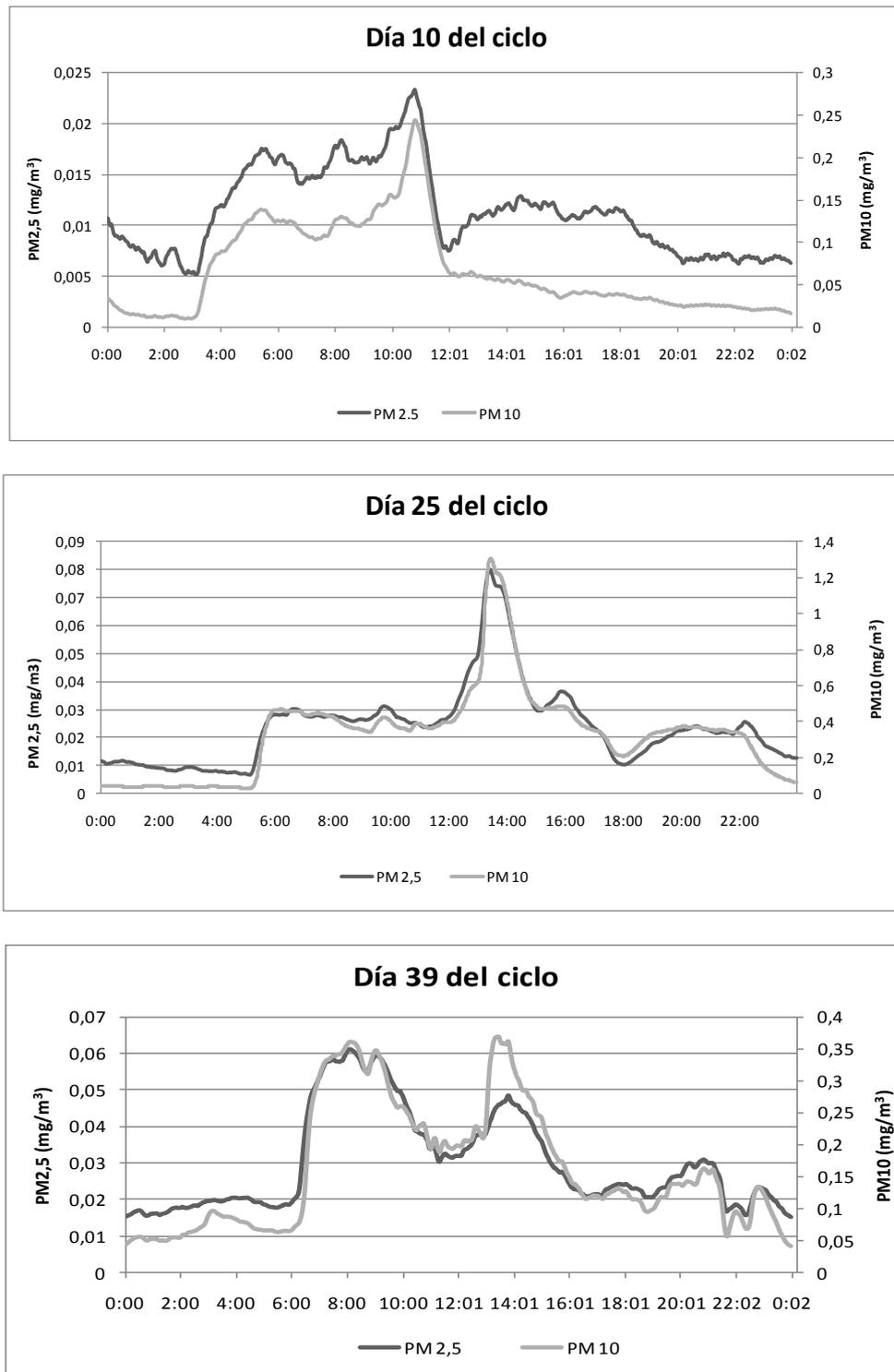


Figura 20. Evolución de PM_{2,5} y PM₁₀ durante 24 horas registrados con el equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM).

Además, tal y como se observa en la **Figura 21** y **Figura 22**, las concentraciones de PM medidas con el TEOM tanto de PM_{2,5} como de PM₁₀ variaron en el tiempo en ambas salas. Además, se observa que el rango de concentraciones a lo largo de un día fue muy amplio. A modo de ejemplo en la semana 5 del ciclo, la PM_{2,5} de la sala 1

alcanzó en un solo día valores de $0,005 \text{ mg/m}^3$ y $0,05 \text{ mg/m}^3$. La concentración medida del PM10 en la sala 2 durante el día 24 del ciclo resulta superior respecto al resto del ciclo, esto se relaciona con el pico de microorganismos (**Figura 18**).

A partir del día 29 del ciclo, una vez se puso en marcha el sistema de “cooling”, aumentó la tasa de ventilación (especialmente en la sala 1), disminuyendo la concentración de partículas, sobre todo la fracción más gruesa. Los cambios en la humedad relativa del aire también pudieran explicar esta evolución, ya que antes del día 29 del ciclo, la humedad relativa del aire se encontraba en niveles cercanos al 40%, aumentando hasta el 65% a partir de aquí. Las partículas del aire pueden absorben humedad, aumentando su tamaño y la velocidad de deposición, es decir, depositan más rápidamente por gravedad debido a su incremento de peso (Hiranuma *et al.*, 2008).

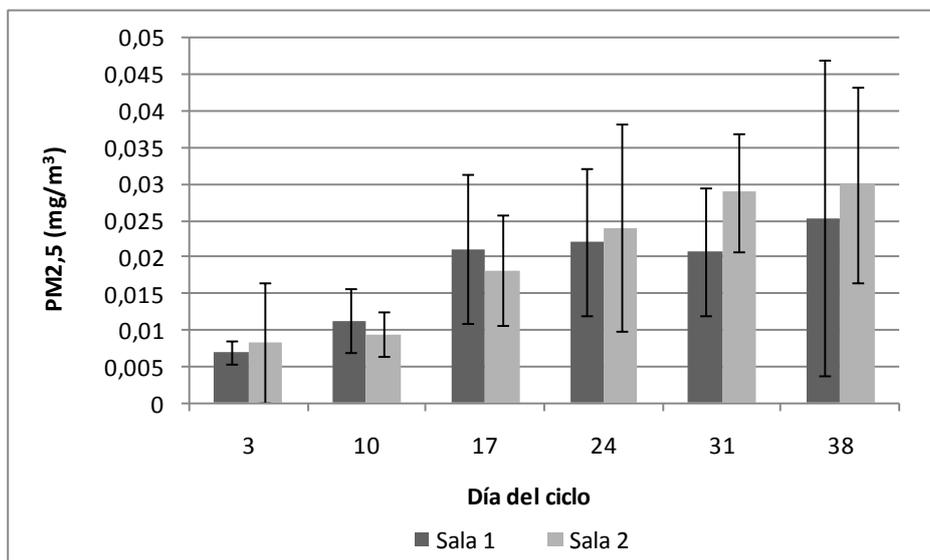


Figura 21. Concentración de PM2,5 medido con el equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM) en las dos salas a lo largo del ciclo.

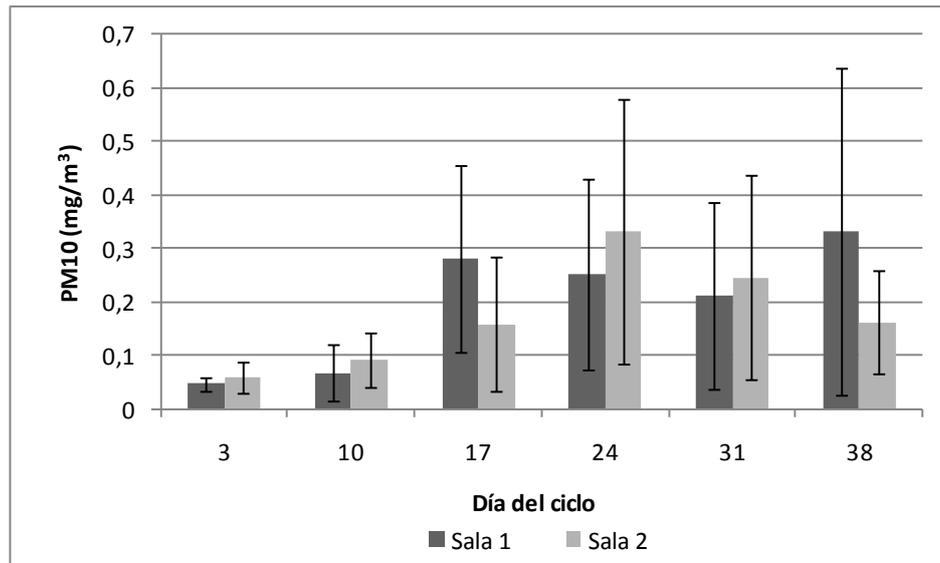


Figura 22. Concentración de PM10 medido con el equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM) en las dos salas a lo largo del ciclo.

Comparando los dos métodos para obtener la concentración de partículas suspendidas en el aire, impactador virtual y TEOM, se observa mayores concentraciones de material particulado registradas con el TEOM para una misma sala y momento del ciclo, aunque en la mayoría de los casos, las mediciones no se hicieron simultáneamente sino en días consecutivos.

No obstante, los niveles de PM fueron muy inferiores a los valores máximos propuestos para protección de la salud de los trabajadores y de los animales: 3,4 de PM10 y 1,7 mg/m³ de PM2,5 (CIGR, 1992). Igualmente, no se superaron los valores máximos de concentración según criterios de salud humana en el ámbito laboral, que están cifrados en 10 y 4 mg/m³ de PM10 y PM 2,5, respectivamente (HSE, 2007).

La concentración de PM total obtenida en este estudio es inferior a la mayoría de resultados aportados por otros autores para el mismo tipo de alojamiento. La PM10 indicada en los diferentes estudios es 0,69 mg/m³ (Roumeliotis y Van Heyst, 2007), 1,21 mg/m³ (Cambra-López *et al.*, 2009), y la PM2,5 es 0,19 mg/m³ (Roumeliotis y Van Heyst, 2007), 0,069 mg/m³ (Cambra-López *et al.*, 2009), 1,19 mg/m³ (Wathes *et al.*, 1997), 1,14 mg/m³ 0,42 mg/m³ (Takai *et al.*, 1998).

5. CONCLUSIONES

De los resultados de la evaluación de la concentración de bacterias aerobias mesófilas y *Salmonella enteritidis* en el ambiente de granjas de broilers con diferentes métodos y su relación con el material particulado, se extraen las siguientes conclusiones:

1. En las condiciones de este estudio, las concentraciones de bacterias aerobias mesófilas en el aire medidas mediante borboteadores variaron entre 4 logUFC/m³ (equivalente a 10⁴ UFC/m³) y 7,48 logUFC/m³ (equivalente a 10⁷ UFC/m³). Se observó un aumento semanal de estas concentraciones, hasta alcanzar el máximo el día 24 del ciclo. A partir de entonces, y probablemente debido al aumento de la tasa de ventilación, los recuentos disminuyeron aunque se mantuvieron con valores elevados, entre 6,7 y 7 log UFC/m³. El recuento total medio de los borboteadores de aire fue de 6,28 logUFC/m³, similar al del impactador en cascada, que fue de 7,11 logUFC/m³. El rango de concentración de bacterias aerobias mesófilas medida con el impactador en cascada fue de 3,8 y 8,8 logUFC/m³ (equivalente a 10³ y 10⁸ UFC/m³).
2. En cuanto a la distribución de las bacterias aerobias mesófilas en el ambiente al comienzo del ciclo (día 3), se observó un mayor número de bacterias ($p < 0.001$) a la altura de los animales (30 cm del suelo) respecto a alturas mayores (entre 150 y 200 cm del suelo) indicando un gradiente en su concentración. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron a partir del día 17 del ciclo, probablemente debido a un aumento de las concentraciones de bacterias aerobias mesófilas totales y a una distribución más homogénea de estas en el aire.
3. En las condiciones de infección experimental de este estudio, se detectó y cuantificó *Salmonella* en la cama 10 días post-infección (día 17 del ciclo), siendo los recuentos del orden de 2 – 3,5 logUFC/g (equivalente a 10² – 10³ UFC por gramo) en este momento y durante el resto del ciclo. Sin embargo, ésta no fue detectada ni cuantificada en el aire ni en las instalaciones hasta los 17 días post-infección (día 24 del ciclo). A partir de este momento, la concentración de *Salmonella* en el aire aumentó a lo largo del ciclo de producción y su distribución en el aire fue prácticamente homogénea.
4. Nuestros resultados confirman que la detección y recuento de *Salmonella* en el aire resulta complicada debido a las bajas concentraciones esperadas y los límites de detección de las diferentes técnicas utilizadas. Sin embargo, a partir de

nuestros resultados se estima que el rango de concentración de *Salmonella* en el aire podría encontrarse entre 10^1 y 10^3 .

5. En este estudio, los niveles de PM fueron inferiores a los valores máximos recomendados para la protección de la salud de los trabajadores y de los animales. En todos los casos, la concentración de material particulado de $2,5 \mu\text{m}$ de diámetro o inferior (PM_{2,5}) fue inferior a la concentración de material particulado de $10 \mu\text{m}$ de diámetro o inferior (PM₁₀). La concentración media varió entre $0,013 \mu\text{g}/\text{m}^3$ con el impactador virtual y $0,019 \mu\text{g}/\text{m}^3$ con el TEOM para PM_{2,5} y entre $0,089 \mu\text{g}/\text{m}^3$ con el impactador virtual y $0,189 \mu\text{g}/\text{m}^3$ con el TEOM para PM₁₀ para todo el ciclo, aunque éstas fueron muy variables respondiendo a la gran variación en las concentraciones de PM que ocurre a lo largo de un día.
6. Las concentraciones de PM aumentaron a lo largo del ciclo de producción igual que los microorganismos en el aire. A partir del día 24, y probablemente debido al aumento de la tasa de ventilación, las concentraciones, especialmente de la fracción más gruesa (PM₁₀) disminuyeron.
7. Según los resultados de este estudio los mayores recuentos de bacterias aerobias mesófilas se asocian a tamaños de partícula de entre $3,3$ y $7 \mu\text{m}$, indicando una mayor asociación de las bacterias aerobias mesófilas a las partículas más gruesas, comparado con las más pequeñas (entre $0,65$ y $3,3 \mu\text{m}$).
8. En el caso de *Salmonella*, el rango de tamaño de partícula al cual se encuentra asociada es mucho mayor: de $0,65 - 1 \mu\text{m}$, $3,3 - 4,7 \mu\text{m}$ a $7 \mu\text{m}$ ó superior. Estos resultados indican que la *Salmonella* puede trasportarse adherida a diferentes sustratos con diferentes tamaños de partícula.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aarnink, A. J. A., Roelofs, P. F. M. M., Ellen, H. H., and Gunnink, H. (1999). *Dust sources in animal houses*. 34-40. Aarhus, Denmark, Proceedings international symposium on dust control in animal production facilities.
- Aarnink, A. J. A. y Ellen, H. H. (2007). *Processes and factors affecting dust emissions from livestock production*. DustConf 2007. How to improve air quality. International conference. Maastricht, The Netherlands.
- Adhikari, A., Reponen, T., Grinshpun, S. A., Martuzevicius, D., y LeMaster, G. (2005). *Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone: A two year study*. Environmental pollution 140, 16-28.
- Andersson, A. M., Weis, N., Rainey, F., y Salkinoja-Salonen, M. S. (1999). *Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres*. Journal of applied microbiology 86(4), 622-634.
- AOAC International. (2003). *Official methods of analysis of AOAC international. Official Method 945.18. Cereals Adjuncts, 17th ed. 2nd revision*. Association of analytical communities, Gaithersburg, MD, USA.
- Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W., y Collinson, S. K. (1998). *Thin aggregative fimbriae enhance Salmonella enteritidis biofilm formation*. FEMS Microbiology letters 162(2), 295-301.
- Bakutis, B., Monstvilienė, E., y Januskeviciene, G. (2004). *Analyses of airborne contamination with bacteria, endotoxins and dust in livestock barns and poultry houses*. Acta veterinaria Brno 73(2), 283-289.
- Banhazi, T. M., Seedorf, J., Rutley, D. L., y Pitchford, W. S. (2005). *Statistical modeling of airborne bacteria and endotoxins concentrations in Australian piggery buildings*. Livestock environment VII, proceedings, 72-78.
- Barker, J. y Bloomfield, S. F. (2000). *Survival of Salmonella in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis*. Journal of applied microbiology 89(1), 137-144.
- Baron, P. A. y Willeke, K. (1993). *Aerosol measurement: Principles, techniques and applications*. Van Nostrand Reinhold, pp. -876.
- Bateman, J. B., Stevens, C. L., Mercer, W. B., y Carstensen, E. L. (1962). *Relative humidity and the killing of bacteria: the variation of cellular water content with external relative humidity or osmolality*. Journal of general microbiology 29(2).
- Berrang, M. E., Northcutt, K. J., y Dickens, J. A. (2004). *The contribution of airborne contamination to Campilobacter counts on defeathered broiler carcasses*. Journal of applied poultry research 13, 1-4.

- Buttner, M. y Stetzenbach, L. (1991). *Evaluation of four aerobiological sampling methods for the retrieval of aerosolized pseudomonas syringae*. Applied and environmental microbiology 57(4), 1268-1270.
- Calvet, S., Cambra-Lopez, M., Blanes-Vidal, V., Estellés, F., y Torres, A. G. (2010). *Ventilation rates in mechanically ventilated commercial poultry buildings in Southern Europe: measurement system development and uncertainty analysis*. Biosystems engineering 106(4), 423-432.
- Cambra-López, M., Aarnink, A. J. A., Zhao, Y., Calvet, S., y Torres, A. G. (2010a). *Airborne particulate matter from livestock production systems: A review of an air pollution problem*. Environmental pollution. In press.
- Cambra-López, M., Hermosilla, T., Lai, H. T. L., Montero, M., Aarnink, A. J. A., and Ogink, N. W. M. (2010b). *Source identification and quantification of particulate matter emitted from livestock houses*. International symposium on air quality and manure management for agriculture. CD-Rom Proceedings of the 13-16 September 2010 Conference. ASABE Publication Number 711P0510cd.
- Cambra-López, M., Torres, A. G., Aarnink, A. J. A., y Ogink, N. W. M. (2010c). *Source analysis of fine and coarse particulate matter from livestock houses*. Atmospheric environment. Accepted. DOI. 10.1016/j.atmosenv.2010.10.018.
- Cambra-López, M., Winkel, A., van Harn, J., Ogink, N. W. M., y Aarnink, A. J. A. (2009). *Ionization for reducing particulate matter emissions from poultry houses*. Transactions of the ASABE 52(5), 1757-1771.
- Chang, C. W. (2001). *Exposure of workers to airborne microorganisms in open-air swine houses*. Applied and environmental microbiology 67(1), 155-161.
- Chinivasagam, H. N., Tran, L., Maddock, L., Gale, A., y Blackall, P. J. (2009). *Mechanically ventilated broiler sheds: a possible source of aerosolized Salmonella, Campylobacter, and Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology. Dic. 2009, 7417-7425.
- CIGR. (1992). *Climatization of animal houses*. Second report of the working group on climatization of animal houses, Centre for climatization of animal houses, pp. 1-147. Ghent, Belgium.
- Clark, S., Rylander, R., y Larsson, L. (1983). *Airborne bacteria, endotoxin and fungi in dust in poultry and swine confinement buildings*. American industrial hygiene association journal, 44(7), 537-541.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., y Lappin-scott, H. M. (1995). *Microbial biofilms*. Annual review of microbiology 49, 711-745.
- Cox, C. S. y Wathes, C. (1995). *Bioaerosols Handbook*. Editors: Cox, C. S. y Wathes, C. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.

- Curtis, S. E., Drummond, J. G., Grunloh, D. J., Lynch, P. B., y Jensen, A. H. (1975). *Relative and qualitative aspects of aerial bacteria and dust in swine Houses*. Journal of animal science 41(5), 1512-1520.
- Davies, S. y Breslin, M. (2001). *Environmental contamination and detection of Salmonella enterica serovar enteritidis in laying flocks*. Veterinary record 149, 699-704.
- Davis, M. y Morishita, T. Y. (2005). *Relative ammonia concentrations, dust concentrations, and presence of Salmonella species and Escherichia coli inside and outside commercial layer facilities*. Avian diseases 49(1), 30-35.
- de Rezende, C. E., Mallinson, E. T., Tablante, N. L., Morales, R., Park, A., Carr, L. E., y Joseph, S. W. (2001). *Effect of dry litter and airflow in reducing Salmonella and Escherichia coli populations in the broiler production environment*. Journal of applied poultry research 10, 245-251.
- Degener, J. E., Heck, M. E., Van Leeuwen, W. J., Heemskerk, C., Crielaard, A., Joosten, P., y Caesar, P. (1994). *Nosocomial infection by Staphylococcus Haemolyticus and typing methods for epidemiological study*. Journal of clinical microbiology 32, 2260-2265.
- Donaldson, A. J., Herniman, K. A. J., Parker, J., y Sellers, R. F. (1970). *Further investigations on the airborne excretion of food-and-mouth disease virus*. Journal of hygiene 68, 557-564.
- Done, S. H., Chennells, D. J., Gresham, A. C. J., Williamson, S., Hunt, B., Taylor, L. L., Bland, V., Jones, P., Armstrong, D., White, R. P., Demmers, T. G. M., Teer, N., y Wathes, C. M. (2005). *Clinical and pathological responses of weaned pigs to atmospheric ammonia and dust*. Veterinary -record. Agriculture biology and environmental sciences (3), 71.
- Donham, K. J. (1991). *Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine*. American journal of veterinary research 52(10), 1723-1730.
- Donham, K. J. y Leininger, J. R. (1984). *Animal studies of potential chronic lung-disease of workers in swine confinement buildings*. American journal of veterinary research 45(5), 926-931.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., y Heederik, D. (2003). *Bioaerosol health effects and exposure assessment: Progress and prospects*. Annals of occupational hygiene 47(3), 187-200.
- 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 13098:2001. (2001). *Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la medición de microorganismos y endotoxinas en suspensión en el aire*.

- 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.
- Gast, R. K., Mitchell, B. W., y Holt, P. S. (2004). *Evaluation of culture media for detecting airborne Salmonella enteritidis collected with an electrostatic sampling device from the environment of experimentally infected laying hens*. Poultry science 83(7), 1106-1111.
- Guarino, M., Caroli, A., y Navarotto, P. (1999). *Dust concentration and mortality distribution in an enclosed laying house*. Transactions of the ASAE 42(4), 1127-1133.
- Gunn, B. A. y Davis, C. N. (1988). *Staphylococcus haemolyticus urinary tract infection in a male patient*. Journal of clinical microbiology 26, 1055-1057.
- Hayes, J. R., Carr, L. E., Mallinson, E. T., Douglass, L. W., y Joseph, S. W. (2000). *Characterization of the contribution of water activity and moisture content to the population distribution of Salmonella spp. in comercial poultry houses*. Poultry science 79, 1557-1561.
- Heber, A., Grant, R., Wu, C. C., Zimmerman, N., Du, P., Lim, T., Fakhoury, K., y Ni, J. (2001). *Atmospheric dispersion of pathogens from ventilation exhaust*. National Pork Producers Council. Iowa, USA.
- 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., y Baughman, G. B. (2006). *Quality-assured measurements of animal building emissions: Particulate matter concentrations*. Journal of the air and waste management association 56(12), 1642-1648.
- Heber, A. J., Stroik, M., Faubion, J. M., y Willard, L. H. (1988). *Size distribution and identification of aerial dust particles in swine finishing buildings*. Transactions of the ASAE 31(3), 882-887.
- Hiranuma, N., Brooks, S. D., Auvermann, B. W., y Littleton, R. (2008). *Using environmental scanning electron microscopy to determine the hygroscopic properties of agricultural aerosols*. Atmospheric environment 42(9), 1983-1994.
- Hirst, J. M. (2005). *Bioaerosols: introduction, retrospect and prospect*. Edición: Cox, C. S. y Wathes, C. M. En: *Bioaerosols Handbook*. Boca Raton, Florida, U.S., Lewis Publishers.
- Homidan, A. A., Robertson, J. F., y Petchey, A. M. (2003). *Review of the effect of ammonia and dust concentrations on broiler performance*. Worlds poultry science Journal 59(3), 340-349.
- HSE. (2007). *List of approved workplace exposure limits*. Health & Safety Executive, pp. 1-18.

- Hugh-Jones, M., Allan, W. H., Dark, F. A., y Harper, G. J. (1973). *The evidence for the airborne spread of Newcastle disease*. Journal of hygiene 71(2), 325-339.
- Hugh-Jones, M. y Wright, P. B. (1970). *Studies on the 1967-8 foot-and-mouth disease epidemic. The relation of weather to the spread of disease*. Journal of hygiene 68, 253-271.
- Just, N., Duchaine, C., y Baljit, S. (2009). *An aerobiological perspective of dust in cage-housed and floor-housed poultry operations*. Journal of occupational medicine and toxicology 4(13).
- Lever, M. S. y Williams, A. (1996). *Cross-infection of chicks by airborne transmission of Salmonella enteritidis PT4*. Letters in applied microbiology 23, 347-349.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2004). *Brock biología de los microorganismos*. 10ª edición, Englewood Cliffs: Prentice Hall International.
- Mallinson, E. T., de Rezende, C. E., Tablante, N. L., Carr, L. E., y Joseph, S. W. (2000). *A management technique to identify prime locations of Salmonella contamination on broiler and layer farms*. Journal of applied poultry research 9, 364-370.
- Martin, W. T., Zhang, Y., Willson, P., Archer, T. P., Kinahan, C., y Barber, E. M. (1996). *Bacterial and fungal flora of dust deposits in a pig building*. Occupational and environmental medicine 53(7), 484-487.
- Matkovic, K., Vucemilo, M., Vinkovic, B., Seol, B., Pavicic, Z., y Matkovic, S. (2007). *Qualitative structure of airborne bacteria and fungi in dairy barn and nearby environment*. Czech journal of animal science 52, 249-254.
- Mitran, L., Harter-Dennis, J. L., y Meisinger, J. J. (2008). *Determining the nitrogen budget and total ammoniacal nitrogen emissions from commercial broilers grown in environmental chambers*. Journal of applied poultry research 17, 34-46.
- Oppliger, A. (2008). *Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification*. Annals of occupational hygiene 52(5), 405-412.
- Pedersen, A. R., Nonnenmann, M., Rautiainen, R., Demmers, T. G. M., Banhazi, T. M., y Lyngbye, M. (2000). *Dust in pig buildings*. Journal of agricultural safety and health 6(4), 261-274.
- Potts, M. (1994). *Dessiccation tolerance of prokaryotes*. Microbiological reviews 58(4), 755-805.
- Power, C. A. (2005). *An investigation into the potential role of aerosol dispersion of dust from poultry barns as a mode of disease transmission during an outbreak of avian influenza (H7:N3) in Abbotsford, BC in 2004*. Bulletin of the aquaculture association of canada 105(1), 7.

- Predicala, B. Z. (2001). *Dust and bioaerosol concentrations in two swine-finishing buildings in Kansas*. Transactions of the ASABE 44(5), 1291-1298.
- Razonable, R. R., Lewallen, D. G., Patel, R., y Osmon, D. R. (2001). *Vertebral osteomyelitis and prosthetic joint infection due to Staphylococcus simulans*. Mayo Clinic Proceedings 76, 1067-1070.
- Roumeliotis, T. S. y Van Heyst, B. J. (2007). *Size fractionated particulate matter emissions from a broiler house in Southern Ontario, Canada*. Science of the total environment 383, 174-182.
- Ryan, E., Wright, C., y Gloster, J. (2007). *Measurement of airborne foot-and-mouth disease virus: Preliminary evaluation of two portable air sampling devices*. The veterinary journal 179, 458-461.
- Rylander, R. y Carneiro, M. F. (2006). *Airways inflammation among workers in poultry houses*. International archives of occupational and environmental health 79(6), 487-490.
- Saleh, M., Seedorf, J., y Hartung, J. (2005). *Influence of animal age and season on bio-aerosol concentrations in a broiler house*. Animals and environment, Volume 2: Proceedings of the XIIth ISAH Congress on animal hygiene, Warsaw, Poland, 4-8 September 2005 .
- Sauter, E. A., Petersen, C. F., Steele, E. E., Parkinson, J. F., Dixon, J. E., y Stroh, R. C. (1981). *The Airborne Microflora of Poultry Houses*. Poultry science 60(3), 569-574.
- Seedorf, J. (2004). *An emission inventory of livestock-related bioaerosols for Lower Saxony, Germany*. Atmospheric environment 38(38), 6565.
- Seedorf, J. (2007). *Emissions and dispersion of livestock-related biological aerosols an overview*. DustConf 2007. How to improve air quality. International conference. Maastricht, The Netherlands.
- Seedorf, J. y Hartung, J. (2001). *Emission of airborne particulates from animal production*. Livestock farming and the environment, 15-22.
- Seedorf, J., Hartung, J., Schroder, 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., Koerkamp, P. W. G. G., Uenk, G. H., y Wathes, C. M. (1998). *Concentrations and emissions of airborne endotoxins and microorganisms in livestock buildings in Northern Europe*. Journal of agricultural engineering research 70(1), 97-109.
- 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., y Wathes, C. M. (1998). *Concentrations and emissions of airborne dust in livestock buildings in Northern Europe*. Journal of agricultural engineering research 70(1), 59-77.

- Tang, J. W. (2009). *The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents*. Journal of the royal society interface 6, 737-746.
- Terzieva, S., Donnelly, J., Ulevicius, V., Grinshpun, S. A., Willeke, K., Stelma, G. N., y Brenner, K. P. (1996). *Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement*. Applied and environmental microbiology 62(7), 2264-2272.
- Thorne, P. S., Kiekhaefer, M. S., Whitten, P., y Donham, K. J. (1992). *Comparison of Bioaerosol Sampling Methods in Barns Housing Swine*. Applied and environmental microbiology 58(8), 2543-2551.
- Verreault, D., Moineau, S., y Duchaine, C. (2008). *Methods for sampling of airborne viruses*. Microbiology and molecular biology reviews 72(3), 413-444.
- Wales, A., Breslin, M., y Davies, R. (2006). *Semiquantitative assessment of the distribution of Salmonella in the environment of caged layer flocks*. Journal of applied microbiology 101, 309-318.
- Wathes, C., Demmers, T. G. M., Teer, N., White, R. P., Taylor, L. L., Bland, V., Jones, P., Armstrong, D., Gresham, A. C. J., Chennells, D., and Done, S. (2002). *Production responses of weaner pigs after chronic exposure to airborne dust and ammonia*. 2002 ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress. Chicago, Illinois, USA., ASAE/CIGR.
- Wathes, C., Sneath, R., and Philips, V. R. (2004). *Particulate emissions from intensively housed livestock: sources and effects*. Proceedings of the AgEng. Leuven, Belgica, Agricultural Engineering International Congress, Leuven 2004. Book of Abstracts.
- Wathes, C. M., Holden, M. R., Sneath, R. W., White, R. P., y Phillips, V. R. (1997). *Concentrations and emission rates of aerial ammonia, nitrous oxide, methane, carbon dioxide, dust and endotoxin in UK broiler and layer houses*. British poultry science 38(1), 14-28.
- Weaver, W. D. y Meijerhof, R. (1991). *The effect of different levels of relative-humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth, and carcass quality for broiler-chickens*. Poultry science 70(4), 746-755.
- White, R. T. (1993). *Aerial pollutants and the health of poultry farmers*. Worlds poultry science journal 49(2), 139-156.
- Wiegand, B., Hartung, J., Hinz, T., y Wiemann, H. D. (1993). *Air quality in lousiana type broiler houses. 2. Bacteria and endotoxin levels in airborne dust*. Landbauforschung volkenrode 43(4), 236-241.
- Wilson, I. G. (2004). *Airborne Campylobacter infection in a poultry worker: case report and review of the literature*. Communicable and Public Health 7(4), 349-353.

- Woodward, C. L., Park, S. Y., Jackson, D. R., Li, X. I., Birkhold, S. G., Pillai, S. D., y Ricke, S. C. (2004). *Optimization and comparison of bacterial load and sampling time for bioaerosol detection systems in a poultry layer house*. Journal of applied poultry research 13(3), 433-442.
- Zhao, Y., Aarnink, A. J. A., Koerkamp, P. W. G. G., Jong, M. C. M., De Doomenbal, P., and Huynh, T. T. T. (2009). *Assessment of the efficiency of four air bio-samplers after aerosolization of enterococcus faecalis suspensions: a preliminary study*. Biennial conference of the Australian society for engineering in agriculture (SEAg), Brisbane 2009.
- Zhu, H., Phelan, P. E., Duan, T., Raupp, G. B., Fernando, H. J. S., y Che, F. (2003). *Experimental study of indoor and outdoor airborne bacterial concentrations in Tempe, Arizona, USA*. Aerobiologia 19, 201-211.
- Zucker, B. A., Trojan, S., y Muller, W. (2000). *Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses*. Journal of veterinary medicine series B-infectious diseases and veterinary public health 47(1), 37-46.
- WHO. (2010). World Health Organization. Programmes and Projects. Media Centre, Fact Sheets, Drug-resistant Salmonella. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Accedido 21 de octubre de 2010.

ANEXOS

ANEXO A. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE SALMONELLA EN EL LABORATORIO: PRESENCIA/AUSENCIA

La detección de *Salmonella* según la técnica de presencia/ausencia, se basa en la ISO 6579:2002.

En este estudio este protocolo se aplicó tanto a las muestras del agua de bebida, pienso, instalaciones y la cama antes de la llegada de los animales, así como en las superficies de las instalaciones y en las muestras de los borboteadores de aire de forma periódica

El protocolo de presencia/ausencia se divide en tres pasos:

a. Pre-enriquecimiento

Preparar una dilución 1:10 de la muestra:

- i. Agua: diluir 1 mL de agua muestreada en 9 mL de agua de peptona.
- ii. Viruta de cama: pesar 25 gramos de la muestra (una por sala) y diluir en 225 mL de agua de peptona estéril, obteniendo de esta forma la dilución 10^{-1} .
- iii. Superficies: diluir la toallita en 100 mL de agua de peptona estéril y homogeneizar.
- iv. Borboteadores de aire: introducir directamente 1 mL de la solución de los impingers en 9 mL de agua de peptona estéril.

Una vez preparada la dilución se incuba a 37°C durante 18 – 24 horas.

b. Enriquecimiento selectivo

Coger 100 µl de la muestra pre-enriquecida y pasarlos a una placa de rappaport-semisólido (Difco, Le Pont de Claix, Francia) e incubar a 42°C durante 24 horas.

c. Aislamiento

Las muestras positivas se siembran en cuatro medios selectivos de cultivo para *Salmonella*: XLD y XLT4 (Difco, Le Pont de Claix, Francia), BGA (Liofichem, TE, Italia) con 50 µg/ml de Kanamicina (Kanamycin sulphate, Sigma-Aldrich, Steinhem, Alemania) y ASAV (AES Chemunex, Bruz, Francia) para obtener colonias aisladas. Incubar a 37°C durante 24 horas.

Se escogen 5 colonias sospechosas aisladas de uno de los medios y se siembran en medio nutritivo, incubar a 37°C durante 24 horas.

d. Confirmación de colonias

La confirmación de colonias se lleva a cabo mediante tres pruebas bioquímicas: MUCAPTEST, prueba de la urea y test API (API-20, bioMerieux, Madrid, España).

ANEXO B. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO

B 1. Recuento en placa

Se utilizó la técnica de recuento en placa para las muestras de cama, las muestras ambientales recogidas mediante la técnica de borboteadores, técnica de impactación y las muestras de cama. Las muestras recogidas borboteadores y técnica de impactación se analizaron para bacterias aerobias mesófilas y *Salmonella* mientras que las muestras de cama se analizaron únicamente para *Salmonella*.

El recuento en placa se realiza a partir de la siembra de diluciones seriadas, a partir de una dilución madre 1:10, de la muestra líquida en agua de peptona de la siguiente manera:

- i. Viruta de cama: pesar 25 gramos de cada muestra (una por sala) y diluir en 225 mL de agua de peptona estéril, obteniendo de esta forma la dilución 10^{-1} . Homogeneizar la dilución para obtener una muestra uniforme. A partir de esta dilución realizar diluciones sucesivas (diluyendo 1 ml de la anterior dilución en 9 ml de agua de peptona estéril) hasta alcanzar la dilución 10^{-5} .
- ii. Borboteadores: introducir directamente 1 mL de la solución de los impingers en 9 mL de agua de peptona estéril (dilución 10^{-1}). A partir de esta dilución, realizar diluciones sucesivas (diluyendo 1 ml de la anterior dilución en 9 ml de agua de peptona estéril). Diluir la muestra hasta la dilución 10^{-3} .
- iii. Impactación en cascada: introducir directamente 1 mL de los 6 mL obtenidos mediante el lavado, en 9 mL de agua de peptona estéril (dilución 10^{-1}). A partir de esta dilución, realizar diluciones sucesivas (diluyendo 1 ml de la anterior dilución en 9 ml de agua de peptona estéril). Diluir la muestra hasta la dilución 10^{-3} .

Se siembra 0,1 mL de cada dilución en superficie mediante asa de digralsky por duplicado en el medio de cultivo de interés:

- Brilliant Green Agar con 50 µg/ml de Kanamicina (Kanamycin sulphate, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) para *Salmonella*. La kanamicina se añade al medio de cultivo para facilitar la selección de la *Salmonella enteritidis* resistente.
- Plate Count Agar (PCA), para aeróbios mesófilos

Una vez sembradas las diluciones se incuban en estufa. Las condiciones de incubación son 37°C durante 24 horas para el medio BGA y 30°C durante 48 horas para el PCA.

Tras la incubación, el recuento de microorganismos se realiza en las placas (diluciones) que contienen entre 30 y 300 colonias.

Las colonias sospechosas de *Salmonella* se aíslan en un medio nutritivo y se realiza confirmación bioquímica. La confirmación de colonias se lleva a cabo mediante tres pruebas bioquímicas: MUCAPTEST, prueba de la urea y test API (API-20, bioMerieux, Madrid, España)

La concentración de *Salmonella* en la cama se determina multiplicando el número de unidades formadoras de colonias por la dilución correspondiente y dividiendo por el volumen sembrado (0,1 mL).

B 2. Número más probable

Se utilizó la técnica del número más probable (NMP), para la cuantificación de la *Salmonella* en el aire muestreado mediante la técnica de borboteadores en el aire.

Preparación de la muestra:

a. Pre-enriquecimiento

De los 9 tubos que se necesitan, rellenar 6 con 9 ml de agua de peptona y 3 se dejan vacíos. Homogeneizar la muestra y añadir 10 ml directamente de la solución a cada uno de los tubos vacíos, 1 ml a 3 de los otros tubos y 0,1 ml a los tres tubos restantes. Estos tubos representan las diluciones: 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} .

Los tubos se incuban a 37°C durante 24 h (Prendergast *et al.*, 2009)

b. Crecimiento selectivo

Se añade 0,1 ml de cada uno de los tubos ya incubados a 10 ml de Rappaport Vassiliadis (RV) y se incuba a 42°C durante 24 horas. (Prendergast *et al.*, 2009)

Lectura de los tubos:

Después del enriquecimiento selectivo, se ha de observar, para cada una de las diluciones, en cuántos tubos ha habido crecimiento.

El número más probable de *Salmonella* en las muestras se obtiene a partir de la combinación de los tubos según el número de éstos en los que se observe o no crecimiento. La combinación resultante se contrasta con las tablas de “Microbiology laboratory guidebook” (Appendix 2.03, USDA, 2008).

Aislamiento, identificación y confirmación de colonias:

El aislamiento e identificación se realiza sembrando la solución enriquecida selectivamente de cada uno de los tubos con resultado positivo en una placa de BGA y otra de XLD y se incuba a 37°C durante 24 horas (Prendergast *et al.*, 2009). La confirmación de colonias sospechosas de *Salmonella* se llevó a cabo mediante tres pruebas bioquímicas: MUCAPTEST, prueba de la urea y test API (API-20, bioMerieux, Madrid, España).