

# **Informe del Estudio de Eficacia de Equipos de NCC™ ReSPR en las instalaciones de la Fundación Centro Tecnológico Andaluz del Sector Cárnico (TEICA)**

**Agosto-Septiembre 2011**

## Índice

<b>1. ReSPR.</b>	<b>6</b>
<b>2. Fundación Centro Tecnológico Andaluz del Sector Cárnico.</b>	<b>7</b>
<b>3. Objetivo.</b>	<b>8</b>
<b>4. Descripción de las instalaciones.</b>	<b>9</b>
<b>5. Desarrollo del estudio.</b>	<b>9</b>
5.1. Toma de muestra de superficies y aire.	10
5.2. Instalación de los equipos de RCI™.	10
5.3. Control microbiológico.	10
<b>6. Protocolos de trabajo microbiológico.</b>	<b>10</b>
6.1. Preparación de la muestra.	11
6.2. <del>Protocolo de trabajo microbiológico</del> <b>Recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C.</b>	<b>11</b>
6.2.1. <del>Recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C.</del>	
6.2.2. <i>Recuento de enterobacterias en VRBG.</i>	11
6.2.3. <i>Recuento de estafilococos coagulasa positiva.</i>	12
6.2.4. <i>Recuento de E. coli en agar T.B.X.</i>	12
6.2.5. <i>Investigación de Listeria monocytogenes.</i>	13
a) Pre-enriquecimiento.	13
b) Enriquecimiento selectivo.	13
c) Aislamiento e identificación sobre medios sólidos selectivos.	14
d) Confirmación bioquímica.	14
f) Expresión de los resultados.	14
<b>7. Resultados y conclusiones.</b>	<b>15</b>
7.1. Análisis microbiológico de aire y superficies.	16
7.2. Análisis microbiológico de alimentos.	18
<b>8. Conclusiones.</b>	<b>30</b>
<b>9. Bibliografía.</b>	<b>31</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Mesófilos aerobios totales muestras de superficie.	16
<b>Tabla 2.</b> Mohos y levaduras muestras de superficie.	16
<b>Tabla 3.</b> Mesófilos aerobios totales muestras de aire.	17
<b>Tabla 4.</b> Mohos y levaduras muestras de superficie.	17
<b>Tabla 5.</b> Evolución de microorganismos mesófilos aerobios totales en carne de pollo y cerdo.	19
<b>Tabla 6.</b> Evolución de enterobacterias en carne de pollo y cerdo.	20
<b>Tabla 7.</b> Evolución de estafilococos en carne de pollo y cerdo.	22
<b>Tabla 8.</b> Evolución de <i>E. coli</i> en carne de pollo y cerdo.	24
<b>Tabla 9.</b> Investigación de <i>L. monocytogenes</i> en carne de pollo y cerdo.	26

## Índice de gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Evolución de m.o. mesófilos aerobios totales en muestras de superficie.	17
<b>Gráfica 2.</b> Evolución de mesófilos aerobios totales en muestras aire.	18
<b>Gráfica 3.</b> Evolución de mohos y levaduras en muestras de aire.	18
<b>Gráfica 4.</b> Evolución m.o. mesófilos aerobios totales en carne de pollo.	19
<b>Gráfica 5.</b> Evolución m.o. mesófilos aerobios totales en carne de cerdo.	20
<b>Gráfica 6 .</b> Evolución de enterobacterias en carne de pollo.	21
<b>Gráfica 7 .</b> Evolución de enterobacterias en carne de cerdo.	21
<b>Gráfica 8.</b> Evolución de estafilococos coagulasa positiva en carne de pollo.	23
<b>Gráfica 9 .</b> Evolución de estafilococos coagulasa positiva en carne de cerdo.	23
<b>Gráfica 10.</b> Evolución de <i>E. coli</i> en carne de pollo.	24
<b>Gráfica 11 .</b> Evolución de <i>E. coli</i> carne de cerdo.	25
<b>Gráfica 12.</b> Evolución de m.o. en carne de pollo en cámaras sin equipos NCC.	28
<b>Gráfica 13.</b> Evolución de m.o. en carne de pollo en cámaras con equipos NCC.	28
<b>Gráfica 14.</b> Evolución de m.o. en carne de cerdo en cámaras sin equipos NCC.	29
<b>Gráfica 15.</b> Evolución de los m.o. en carne de cerdo en cámaras con equipos NCC.	29

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Laboratorio de microbiología.	7
<b>Figura 2.</b> Laboratorio de físico-química.	7
<b>Figura 3.</b> Siembra positiva y negativa de enterobacterias en muestras de pollo.	22
<b>Figura 4.</b> Caldo Fraser muestras positivas <i>L. monocytogenes</i> .	26
<b>Figura 5.</b> Siembra en compass Listeria resultados positivo y negativos.	26
<b>Figura 6.</b> Compass L mono confirm negativo.	27
<b>Figura 7.</b> Compass L. mono confirm positivo.	27
<b>Figura 8.</b> Galería de identificación bioquímica y resultado positivo <i>L. monocytogenes</i> .	27

## 1. ReSPR

ReSPR es una compañía líder mundial con la tecnología NCC especializada en el tratamiento ambiental con más de 15 años de experiencia en el mercado americano y con presencia mundial. Con origen en EEUU su división industrial de sistemas de fotocatalisis activa NCC™ permite trasladar la más avanzada tecnología al mercado, la cual ha sido probada y testada en el espacio. La tecnología actúa limpiando el aire interior como la naturaleza limpia el exterior. Al contrario que los productos que eliminan olores con tecnologías pasivas, ReSPR utiliza hasta 5 formas basadas en la naturaleza, tecnologías activas que llevan la solución al problema. Las tecnologías pasivas incluyen filtros y purificadores de aire electrónicos que necesitan que el aire llegue al aparato. Las tecnologías de los purificadores de aire ReSPR trabajan juntas para limpiar el aire interior, como lo haría la naturaleza al aire exterior. Es el único producto con probando la reducción de hasta el 99.99% de hongos, bacterias y virus, incluyendo MRSA y la Gripe A sobre las superficies, según estudios realizados por la empresa.

Introduciendo la adecuada longitud de onda de la luz en la matriz catalítica NCC, ReSPR Environmental ha desarrollado un sistema ultraefectivo para utilizar las propiedades de las lámparas germicidas ultravioletas (UV Light). En el espectro luminoso entre la luz ultravioleta y los Rayos-X invisibles, el sistema UVX utiliza el mismo nivel de oxidación y ionización de la luz como ocurre de similar forma con la luz solar. El sistema NCC se crea partiendo de estas propiedades de la ionización y combinándolas con reacciones fotocatalíticas de metales nobles específicamente determinados. Esta innovación disruptiva en el uso de la luz es lo que hace la tecnología NCC™ tan efectiva.

Las unidades ReSPR INDUCT se instalan en cualquier sistema de climatización o directamente hacia el plenum y también directamente debajo de cualquier impulsión de ventilación que este ubicada en la corriente de flujo del aire. Estas unidades trabajan el aire sin tratar convirtiendo el vapor de agua (H<sub>2</sub>O) y el oxígeno (O<sub>2</sub>) directamente en hydro-peróxidos y grupos hidróxilos, eliminando olores, hongos, bacterias y virus, y creando un ambiente interior saludable. El aire no tratado se introduce por los ventiladores de las Unidades de Tratamiento de INDUCT y expulsan aire completamente tratado a través de las salidas de aire.

## 2. Fundación Centro Tecnológico Andaluz del Sector Cárnico

La Fundación Centro Tecnológico Andaluz del Sector Cárnico es una fundación sin ánimo de lucro, que tiene como objetivo principal contribuir al desarrollo y mejora del sector cárnico andaluz y lograr la competitividad de las empresas en los mercados nacionales e internacionales. La introducción de nuevas tecnologías que permitan la optimización de procesos y productos es una prioridad para el Centro.

Entre las actividades que realiza se incluye la validación y verificación efectividad de técnicas y metodologías a escala piloto, y poder realizar la transferencia e implementar nuevas tecnologías y procedimientos en las empresas interesadas.

El Centro Tecnológico, dispone de una planta piloto y en ella se llevan a cabo los estudios y proyectos de investigación que el Centro lleva a cabo por iniciativa propia y los proyectos en los participa con empresas y otros centros de investigación. La planta consta de una cámara de refrigeración, un túnel de congelado, una cámara de salazón y tres secaderos. En la cámara de refrigeración y salazón se han realizado los ensayos con los equipos de fotocatalisis de la empresa ReSPR Europa S.L.

Teica además tiene sus propios laboratorios equipados para la realización de ensayos.



**Figura 1.** Laboratorio de Microbiología



**Figura 2.** Laboratorio de Físico-química

### 3. Objetivo

Comprobar el efecto que los equipos instalados por la empresa ReSPR Europa S.L. tiene sobre las cámaras y sobre las piezas cárnicas almacenadas en las instalaciones de TEICA.

### 4. Descripción de las instalaciones

El estudio fue realizado en las instalaciones de la planta piloto de TEICA en las cámaras de refrigeración y salado. Ambas cámaras se mantienen una temperatura de entre 0y 4°C. En la cámara de refrigeración se colocaron los equipos NCC objeto del estudio y la cámara de salado fue la cámara de referencia. Los ensayos microbiológicos y físico-químicos se realizaron en el laboratorio de TEICA.

#### 1. Cámara de refrigeración.

La cámara de refrigeración almacena productos y muestras que deben ser mantenidos a temperaturas de entre 0 y 4°C. Tiene un volumen de 33,02 m<sup>3</sup>. En esta cámara se instalaron los equipos NCC objeto del estudio, y es donde habitualmente se almacenan los productos para su conservación.

#### 2. Cámara de salazón.

La cámara de salazón es la cámara utilizada para el salado los productos cárnicos de los distintos ensayos que se llevan a cabo en el Centro. Tiene una temperatura que oscila entre los 0°C y los 4°C, similar a la que alcanza la cámara de refrigerado. Sus dimensiones son de 40,38m<sup>3</sup>.

Se seleccionaron estas dos cámaras por su semejanza en cuanto a las dimensiones y porque las dos cámaras se mantienen a la misma temperatura. De esta manera las condiciones en las que se han conservado los productos cárnicos para realizar los ensayos han sido las mismas y es posible comparar los resultados obtenidos.



## 5. Desarrollo del estudio

El estudio se inició el 27 de Julio. Los equipos fueron instalados por el técnico de la empresa en la cámara de refrigeración de 4°C.

Previa a la instalación y puesta en marcha se tomaron muestras de superficies y aire de ambas cámaras según el protocolo que a continuación se detalla:

### 5.1. Toma de muestra Superficies y Aire.

Se tomaron 2 muestras en cada una de las cámaras de dos puntos distintos. La toma de muestra de superficies fue realizada con esponja prehidratada y libre de biocidas, Sponge-Stick 3M™, según indicaciones del fabricante. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

Los parámetros microbiológicos analizados en las muestras de superficie fueron:

- Microorganismos aerobios-mesófilos totales.
- Enterobacterias.
- Mohos y Levaduras.

La toma de muestras de aire se realizó directamente utilizando placas RODAC. Las placas se mantuvieron abiertas durante 5 minutos, y posteriormente se incubaron en estufas de cultivo, según instrucciones del fabricante. Además de este método, y para verificar resultados, se realizó una modificación utilizando, placas petri con medio específico para los distintos parámetros objeto del estudio, que al igual que en las muestras de superficie fueron:

- Microorganismos aerobios-mesófilos totales (PCA).
- Enterobacterias (VRBG).
- Mohos y Levaduras (Sabouraud-Cloranfenicol).

La toma de muestra y el análisis fue realizado teniendo en cuenta las recomendaciones de los técnicos de la empresa, y siguiendo un cronograma establecido para todas las muestras, que se especifica en el punto 5.3.

### 5.2. Instalación de los equipos de RCI™.

El técnico de la empresa ReSPR Europe S.L instaló un equipo DuctStation de RCI™ de acuerdo a las dimensiones de la cámara de TEICA.

### 5.3. Control microbiológico del estudio.

El control microbiológico del estudio se llevó a cabo sobre piezas cárnicas, muslos de pollo y cabeza de cerdo, compradas en establecimiento comercial, con lo cual asegurábamos que se cumplían los parámetros de calidad establecidos por la legislación para alimentos destinados a consumo humano.

En cada una de las cámaras se almacenaron dos bandejas de cada producto hasta su análisis. Una bandeja con cinco piezas de cabeza de cerdo y una bandeja con muslos de pollo.

Los ensayos microbiológicos realizados a los productos cárnicos fueron los siguientes:

- Microorganismos aerobios-mesófilos totales.
- Enterobacterias.
- Recuento de estafilococos coagulasa positiva.
- Recuento de *E. coli*.
- Investigación de *L. monocytogenes*.

Los tiempos de análisis de los productos cárnicos, muestras de aire y superficies se realizaron:

T=0 días. Día de instalación del equipo (27/07/2011)

T=2 días. (29/07/2011)

T=5 días. (01/08/2011)

T=7 días. (03/08/2011)

T=9 días. (05/08/2011)

## 6. Protocolos de trabajo microbiológico

### 6.1. Preparación de la muestra

Para el análisis microbiológico, las muestras se analizaron por duplicado y en condiciones de esterilidad. Se pesaron 25 gramos de muestra tomadas heterogéneamente y se diluyeron en 225 ml de caldo agua de peptona tamponada (APT) utilizando bolsas con filtro. Las diluciones madre se homogenizaron en un homogenizador de paletas para iniciar el análisis microbiano, tras el correspondiente tiempo de revivificación.

Del mismo modo se pesaron y homogenizaron 25 gramos de carne que fue diluida en 225 ml de Caldo Fraser (CF) para la investigación de *L. monocytogenes*.

## 6.2. Protocolos de trabajo microbiológico

### 6.2.1. Recuento de los microorganismos aerobios mesófilos a 30°C (norma AFNOR V08-011 – Julio 2001)

#### **Principio**

El agar “Standard Plate Count Agar” denominado PCA se utiliza para el recuento de gérmenes aerobios totales en diferentes matrices alimentarias, así como para el análisis de productos farmacéuticos, de productos cosméticos y de sus materias primas.

#### **Método**

Pesar la cantidad indicada por el fabricante, adicionar agua destilada y autoclavar el medio. Colocar 1 ml del producto a analizar o de sus diluciones decimales en las placas de Petri estériles.

Debajo de la campana de flujo laminar depositar 12 ml del agar preparado cuando alcance la temperatura de 45-50°C. Agitar para mezclar bien y dejar solidificar.

Incubar de forma invertida a 30°C durante 72 horas.

#### **Resultados**

Contar todas las colonias sobre las placas de Petri que contengan entre 10 y 300 colonias.

### 6.2.2. Recuento de enterobacterias en V.R.B.G (ISO 21528-2:2004 e ISO/TS 11133-2:2003)

#### **Principio**

El agar V.R.B.G. se utiliza para la identificación y recuento de bacterias Coliformes (*Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) de diferentes matrices alimentarias y también el agua.

La presencia de cristal violeta y de sales biliares inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y otras bacterias Gram negativas. La degradación de la lactosa en ácido, característica de los Coliformes, se revela mediante el viraje a rojo del indicador de pH, el rojo neutro, así como por un precipitado de ácidos biliares formando un halo alrededor de las colonias.

#### **Método**

Pesar la cantidad indicada por el fabricante y llevar hasta ebullición. Conservar a temperaturas de 45-50°C hasta su utilización.

Colocar 1 ml del producto a analizar y de sus diluciones decimales en placas de petri estériles.

Debajo de la campana de flujo laminar depositar alrededor de 12 ml de medio fundido estéril. Homogeneizar bien y dejar solidificar. Colocar una segunda capa de medio (su espesor será de alrededor de 2 mm). Dejar solidificar de nuevo, incubar de forma invertida a 37°C durante 24-48 horas.

### **Recuentos**

Contar las colonias rosadas a violeta que tengan un diámetro de al menos 0,5 mm, rodeadas de un halo de sales biliares precipitadas. La cifra obtenida se tomará en la prueba del producto a analizar.

#### **6.2.3. Recuento de estafilococos coagulasa positiva**

##### **Principio**

El Agar Baird Parker RPF (RPF= Rabbit Plasma Fibrinogen) es un medio sólido para la detección y enumeración de estafilococos coagulasa positiva. El medio tiene una ventaja de ser un medio selectivo para el recuento de estafilococos positivos y permite el recuento y confirmación en una sola etapa. La producción de coagulasa se considera la principal característica para reconocer la patogenicidad de cepas de estafilococos, en particular *Staphylococcus aureus*, y fue el origen de los desarrollos de Bair Parker con Plasma de conejo.

##### **Método**

A partir de la dilución madre preparada se siembra en placa 0,1 o 1 ml distribuido homogéneamente sobre 2-3 placas de medio utilizando el asa de drigalski.

##### **Recuentos**

Las colonias coagulasa positivas se caracterizan por la formación de colonias negras o grises con un halo opaco alrededor perfectamente visible. Los recuentos se hacen sobre aquellas placas que contienen entre 10-300 colonias características.

#### **6.2.4. Recuento de *E. coli* en agar T.B.X (Tryptone Bilis X-Glucose Agar) . (ISO 16649-2 – julio 2001)**

##### **Principio**

El agar T.B.X. es un medio selectivo para el recuento sin confirmación de *Escherichia coli* en los productos alimenticios. Su composición es conforme a las recomendaciones de la norma ISO 16449-2. La selectividad del medio se asegura mediante la presencia de sales biliares que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivo. El sustrato cromogénico X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3 indolil b-D-glucuronato) permite la detección de la b-glucuronidasa, enzima que poseen la mayoría del 97% de las cepas de *Escherichia coli* y algunas cepas de otras enterobacterias, como las *Salmonella* o las *Shigella*.

##### **Resultados**

Las colonias de *Escherichia coli* son azules.

### **Método**

Para un recuento, colocar 1 ml del producto a analizar o de sus diluciones decimales en placas de Petri estériles. Debajo de la campana de flujo laminar colocar 15 ml de medio refundido estéril. Homogeneizar bien y dejar solidificar. Incubar 24-48 h a 44,5°C.

### **Límites y precauciones**

La presencia de una flora de competición superior a 150 colonias por placa puede entorpecer la lectura. Algunas otras cepas de enterobacterias dan también colonias azules (*Salmonella*, *Shigella*).

### **6.2.5. Investigación de *L. monocytogenes***

#### **a) Pre-enriquecimiento.**

La preparación de la muestra se realizará llevando a cabo las indicaciones observadas para la preparación de la muestra. En función de la cantidad de muestra que se quiera detectar la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes*,

Una vez homogenizada la muestra de caldo FS se incuba a 30±1 °C durante 24±2 horas. Añadiendo la cantidad de citrato férrico determinada por el fabricante. Durante la incubación puede desarrollarse un color negro debido a que *Listeria monocytogenes* hidroliza la esculina del medio a glucosa y esculentina que forma un complejo de color pardo oscuro con los iones férricos provenientes del citrato férrico, la ausencia de coloración no es indicativo de ausencia de la bacteria en la solución.

Durante esta fase se recuperan parte de las *Listerias* spp. dañadas.

#### **b) Enriquecimiento selectivo.**

Tras la etapa de pre-enriquecimiento se pasa a la fase de enriquecimiento selectivo en caldo FC. El caldo FS contiene una elevada concentración de cloruro sódico que incrementa su selectividad. El cloruro de litio inhibe el crecimiento de cocos entéricos capaces al igual que *Listeria* de hidrolizar la esculina presente. La acriflavina inhibe el crecimiento de otros Gram + y el ácido nalidíxico, bloquea la replicación del ADN de las bacterias sensibles a este agente bacteriano. De manera que durante esta fase se estimula el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, inhibiendo el crecimiento del resto de la flora acompañante y se recuperan las *Listeria* spp. en estado subletal. Para ello se toma una alícuota de 0,1 ml de la solución enriquecida en caldo FS y se añade a un tubo conteniendo 10 ml de Caldo FS. Se homogeniza el conjunto por agitación. El medio inoculado se incuba a 37°C±1° C durante 48 horas.

### **c) Aislamiento e identificación sobre medios sólidos selectivos.**

Finalizado el periodo de incubación del cultivo en Caldo FS, por medio de un asa de siembra estéril se tomará una porción de dicho cultivo y se siembra en estría sobre la superficie de una placa Petri conteniendo Agar Cromogénico específico para el aislamiento de *L. monocytogenes* previamente preparado. Las placas se incubarán en posición invertida a 37 °C durante 48 horas).

Sobre Agar cromogénico, *Listeria monocytogenes* crece formando colonias verde-azuladas, rodeadas de un halo opaco.

### **d) Confirmación bioquímica.**

Se tomarán al menos 3 colonias características crecidas el medio selectivo para su confirmación, o todas si hubiesen crecido menos de dicho número (para análisis reglamentarios se exige confirmación de un mínimo de 5 colonias por placa, pero para análisis rutinarios se confirmarán al menos 2 colonias).

Se utilizarán galerías comerciales de identificación bioquímica y hemolítica “Listeria-ID-galerías”, que permiten diferenciar a nivel de especie directamente desde los medios selectivos de aislamiento sin necesidad de purificar el cultivo y además llevan incluido el test de la hemolisina, permitiendo detectar la  $\beta$ -hemólisis directamente a partir de hematíes (Método aprobado por Enmienda 1:2004 (E) a la UNE-EN ISO 11290-2:2000).

### **e) Expresión de los resultados.**

El resultado se considerará positivo si todas las pruebas bioquímicas y la prueba de la  $\beta$ -hemólisis, se ajustan a *Listeria monocytogenes* según el procedimiento de identificación de la galería, en tal caso se expresará el resultado como:

Presencia /25gr o ml, cuando se parta de 25g de muestra. En caso de que la confirmación colonial sea negativa se expresará el resultado: Ausencia /25gr o ml, cuando se parta de 25g de muestra.

Como método alternativo para agilizar la investigación de *L. monocytogenes* se utilizará el método validado por AFNOR según ISO 16140, que permite tener resultados negativos en 48 horas y utilizar un solo medio de enriquecimiento y confirmación basado en la acidificación de la ramnosa y la puesta de manifiesto de la enzima fosfolipasa. Aunque estas pruebas garantizan la presencia de *L. monocytogenes*, se comprobará siempre con galerías de identificación Microgen™ID System la presencia de la bacteria.

## 7. Resultados y conclusiones

El Real Decreto 2073/2005 de 15 de Noviembre, hace referencia a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, y en él se establecen las normas de aplicación que deben cumplir los explotadores de las empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene generales y específicas contempladas en el artículo 4 del Reglamento (CE) nº852/2004. Según este documento los criterios de seguridad alimentaria que deben ser tenidos en cuenta para controlar la calidad microbiológica de los productos cárnicos incluidos en este estudio (carne de cerdo y carne de pollo) son los relativos a *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.

El R.D. establece que *L. monocytogenes* debe estar ausente en alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales. En alimentos listos para el consumo que puedan favorecer el desarrollo de la bacteria, que no sean destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales se permite la presencia de la bacteria hasta 100ufc/g antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido, en productos comercializados durante su vida útil. Además este límite de 100 ufc/g también se aplica a productos listos para el consumo que no puedan favorecer el desarrollo de la bacteria y que no sean destinados a lactantes y usos médicos especiales y durante su vida útil.

El criterio que se aplica para carne picada y preparados de carne destinados a ser consumidos crudos para *Salmonella* spp. es ausencia en 25 gramos.

Para los productos cárnicos de este estudio, que no van destinados a lactantes ni para usos médicos especiales, y que no van a ser consumidos crudos se aplica el criterio de ausencia de *Salmonella* spp. en 25 gramos y se permite la presencia de *L. monocytogenes* hasta las 100ufc/g.

Teniendo en cuenta que los productos objeto de este estudio, proceden de un establecimiento comercial, cumplen con los requisitos sanitarios establecidos, damos por supuesto que no se detecta *Salmonella* spp. ya que, si ha pasado el control de calidad, y hay ausencia de la bacteria en todo el lote, no va a crecer en el producto durante su vida comercial, por lo que no se analizó la presencia de *Salmonella* spp. en los alimentos de este estudio. Se investigó la presencia de *L. monocytogenes* porque en estos productos se permite la presencia hasta de 100 ufc/g, y de esta manera se podía controlar la evolución.

El análisis de microorganismos aeróbios-mesófilos totales, enterobacterias, estafilococos y *E. coli*, se realiza según el criterio del laboratorio, para comprobar el estado microbiológico inicial de los productos y valorar la evolución de estos parámetros en el tiempo, cuya presencia indicaría que las

condiciones higiénico-sanitarias durante el procesado, y el sistema de control de calidad deben ser revisados. Así mismo se realiza el análisis de superficies y aire de las cámaras para controlar las condiciones iniciales de las cámaras en las que se conservan los alimentos objeto de este estudio y la evolución que éstas experimentan en el tiempo.

Los resultados de análisis de aire y de superficies, así como el análisis microbiológico y físico-químico se muestran a continuación.

### 7.1. Análisis microbiológico aire y superficie

Las instalaciones del Centro son relativamente nuevas, y el sistema de limpieza que se utiliza es muy eficiente y está muy controlado, por lo que la carga microbiana al inicio del estudio es inferior a 10 ufc/m<sup>3</sup>, excepto para mohos y levaduras que es de 10 ufc/m<sup>3</sup>, por este motivo el efecto bactericida que los equipos de NCC ejercen en el ambiente de la cámara quizás no se ha apreciado con la magnitud que le corresponde, ya que se partía de una concentración microbiana baja.

No se ha detectado la presencia de enterobacterias en ninguna de las dos cámaras durante el tiempo de estudio. Los resultados de microorganismos aerobios mesófilos y mohos y levaduras se muestran a continuación.

En los análisis de superficies los mohos y levaduras se mantienen por debajo del límite de detección durante todo el estudio. Los recuentos de mesófilos aerobios totales inicialmente también se encuentran por debajo del límite de detección, pero se incrementan ligeramente a los dos días de análisis. El quinto análisis se realiza después de la limpieza y desinfección de las cámaras por lo que no se detectan microorganismos. Las toma de muestra de los días 7 y 9 muestran un incremento de dos logaritmos en la cámara sin equipos con respecto a las cámaras en las que se instalaron los equipos tal y como se muestra en las cámaras y en las gráficas.

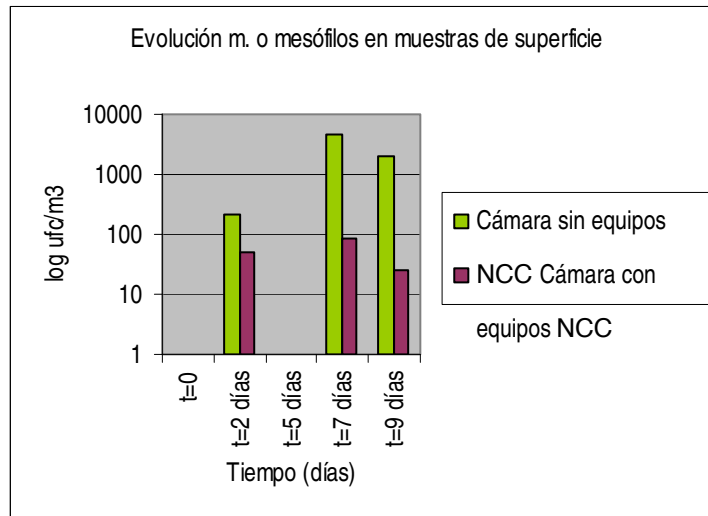
Muestras superficie	Aerobios mesófilos totales				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
<b>Cámara sin equipos</b>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	210 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	4550 ufc/m <sup>3</sup>	2000 ufc/m <sup>3</sup>
<b>Cámara con equipos</b>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	52 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	85 ufc/m <sup>3</sup>	25 ufc/m <sup>3</sup>

Tabla 1. Aerobios Mesófilos totales muestras de superficie.

Muestras superficie	Mohos y levaduras				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
<b>Cámara sin equipos</b>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>
<b>Cámara con equipos</b>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>

Tabla 2. Mohos y levaduras muestras de superficie.





**Gráfica 1.** Evolución de microorganismos mesófilos aerobios totales en muestras de superficie.

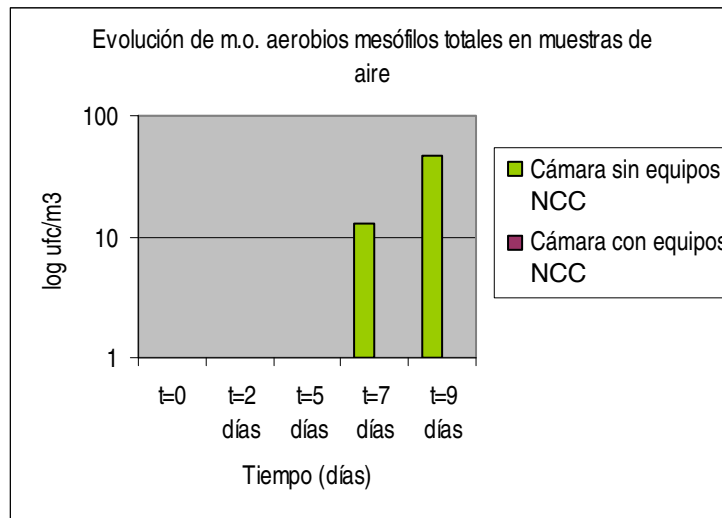
En los análisis los recuentos de microorganismos aerobios-mesófilos totales están por debajo del límite de detección y se detectan mohos y levaduras a bajas concentraciones en ambas cámaras. Los recuentos de mohos y levaduras y de microorganismos aerobios mesófilos totales se reducen por debajo del límite de detección durante todo el estudio en la cámara en la que se instaló el equipo NCC, y sí que se detectan microorganismo aerobios mesófilos totales y mohos y levaduras en la cámara sin equipo.

Muestras aire	Aerobios mesófilos totales				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
<b>Cámara sin equipos</b>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	13 ufc/m <sup>3</sup>	46,6 ufc/m <sup>3</sup>
<b>Cámara con equipos</b>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>

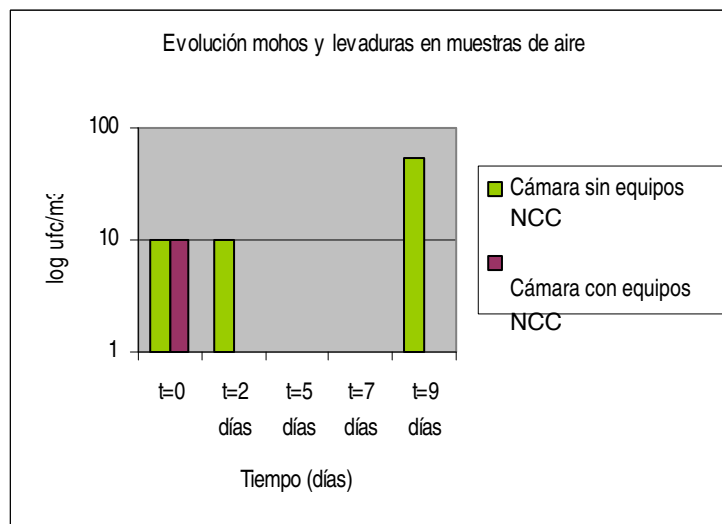
**Tabla 3.** Aerobios Mesófilos aerobios totales muestras de aire.

Muestras aire	Mohos y levaduras				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
<b>Cámara sin equipos</b>	10 ufc/m <sup>3</sup>	10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	55 ufc/m <sup>3</sup>
<b>Cámara con equipos</b>	10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>	<10 ufc/m <sup>3</sup>

**Tabla 4.** Mohos y levaduras muestras de superficie.



**Gráfica 2.** Evolución de microorganismos mesófilos aerobios totales en muestras de aire.



**Gráfica 3.** Evolución de mohos y levaduras en muestras de aire.

## 7.2. Análisis microbiológico de alimentos: Carne de cerdo y pollo.

Los resultados de los análisis microbiológicos de los alimentos conservados en las cámaras objeto de estudio y de referencia se muestran a continuación. Los parámetros se analizan por separado y se comparan los resultados de las dos cámaras, además se incluye la evolución de los cuatro productos.

### ➤ Aerobios mesófilos

Los niveles iniciales de mesófilos de las dos muestras están dentro de los límites que se consideran adecuados para que un alimento sea consumido y cumpla con los estándares de calidad, aunque hoy día no existe ninguna legislación que marque este parámetro ya que como se ha quedado reflejado

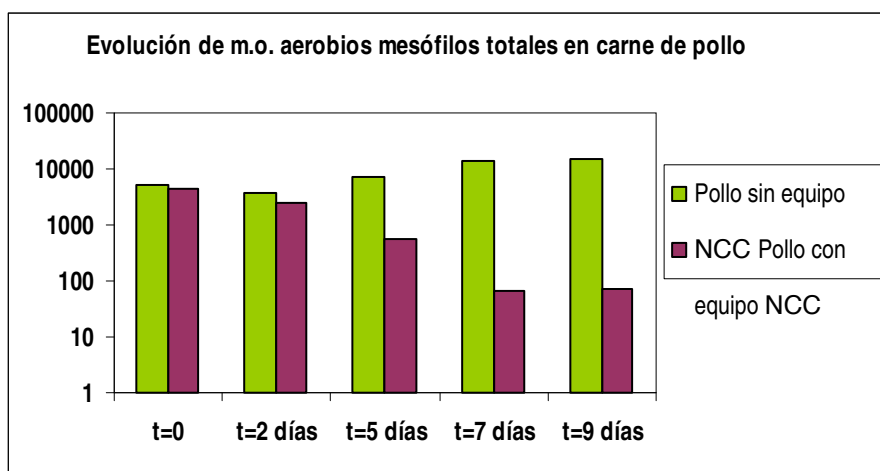
anteriormente el RD 2073/2005 sólo hace referencia a los patógenos *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.

Los análisis realizados durante los nueve días muestran como se produce un incremento de los niveles de mesófilos aerobios totales en las cámaras en las que no se instalaron equipos NCC, mientras que se produce un descenso significativo en el número de microorganismos mesófilos aerobios totales en la cámara con equipos NCC.

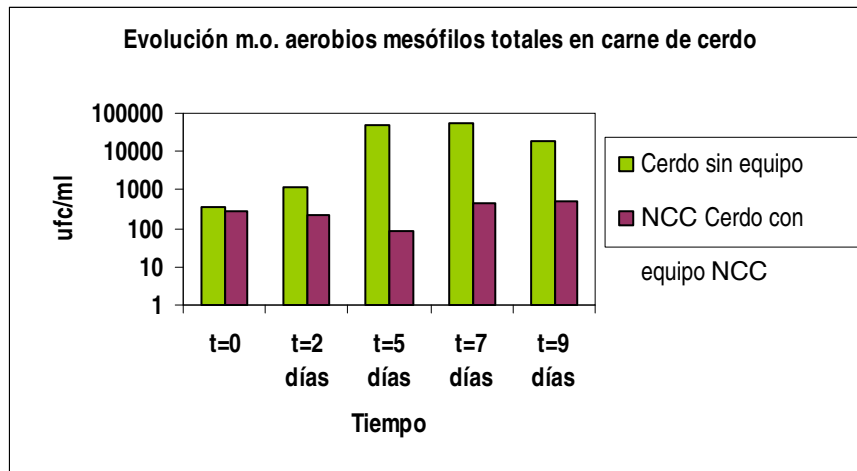
El análisis por productos muestra que en el pollo existe un descenso de 2 unidades logarítmicas y una diferencia de 3 logaritmos con respecto al producto almacenado en cámara sin equipos. En el cerdo los microorganismos se mantienen constantes durante el estudio, observándose una diferencia de 2 logaritmos con respecto al producto almacenado en cámara sin equipo.

Muestra	Microorganismos aerobios mesófilos totales				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
<b>Pollo almacenado en cámara sin equipo NCC</b>	5200 ufc/ml	3600 ufc/ml	7000 ufc/ml	13650 ufc/ml	15000 ufc/ml
<b>Pollo almacenado en cámara con equipo NCC</b>	4450 ufc/ml	2500 ufc/ml	550 ufc/ml	65 ufc/ml	70 ufc/ml
<b>Cerdo almacenado en cámara sin equipo NCC</b>	365 ufc/ml	1133,3 ufc/ml	47000 ufc/ml	54000 ufc/ml	18500 ufc/ml
<b>Cerdo almacenado en cámara con equipo NCC</b>	295 ufc/ml	210 ufc/ml	85 ufc/ml	465 ufc/ml	540 ufc/ml

**Tabla 5.** Evolución de microorganismos mesófilos aerobios totales en carne de pollo y cerdo



**Gráfica 4.** Evolución microorganismos mesófilos aerobios totales en carne de pollo.



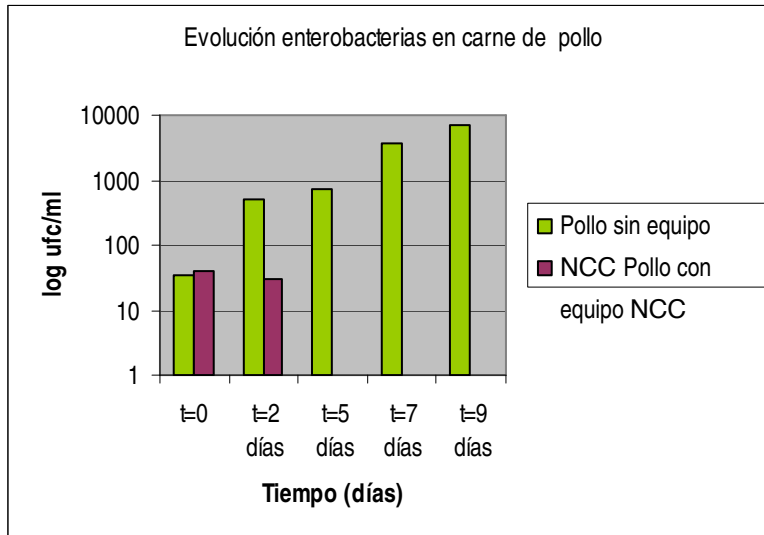
Gráfica 5. Evolución microorganismos mesófilos aerobios totales en carne de cerdo.

### ➤Enterobacterias

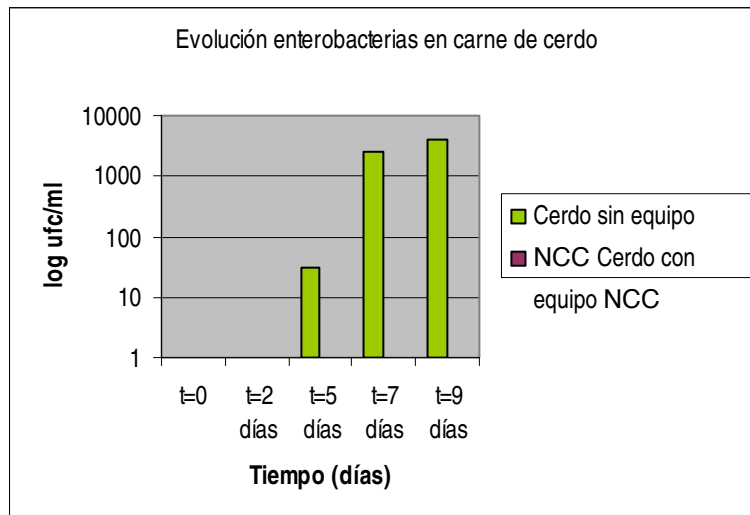
Las carga inicial de enterobacterias en cerdo fue inferior a 10 ufc/ml y en pollo se detectaron enterobacterias, a baja concentración. En pollo almacenado en cámara sin equipo NCC la concentración de enterobacterias se incrementó hasta alcanzar al final del ensayo una concentración de  $10^4$  ufc/ml. El pollo almacenado en cámara con equipo NCC se mantuvo durante todo el estudio en los niveles iniciales, obteniendo un recuento inferior al límite de detección el día después de la limpieza de las cámaras. En el cerdo los niveles iniciales fueron inferiores a 10 y se mantuvieron constantes para el producto almacenado en cámara con equipo. En la cámara sin equipo NCC se incrementó la concentración de enterobacterias hasta  $10^3$  ufc/ml.

Muestra	Enterobacterias				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
Pollo almacenado en cámara sin equipo NCC	35 ufc/ml	500 ufc/ml	750 ufc/ml	13650 ufc/ml	15000 ufc/ml
Pollo almacenado en cámara con equipo NCC	40 ufc/ml	30 ufc/ml	<10 ufc/ml	65 ufc/ml	70 ufc/ml
Cerdo almacenado en cámara sin equipo NCC	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml

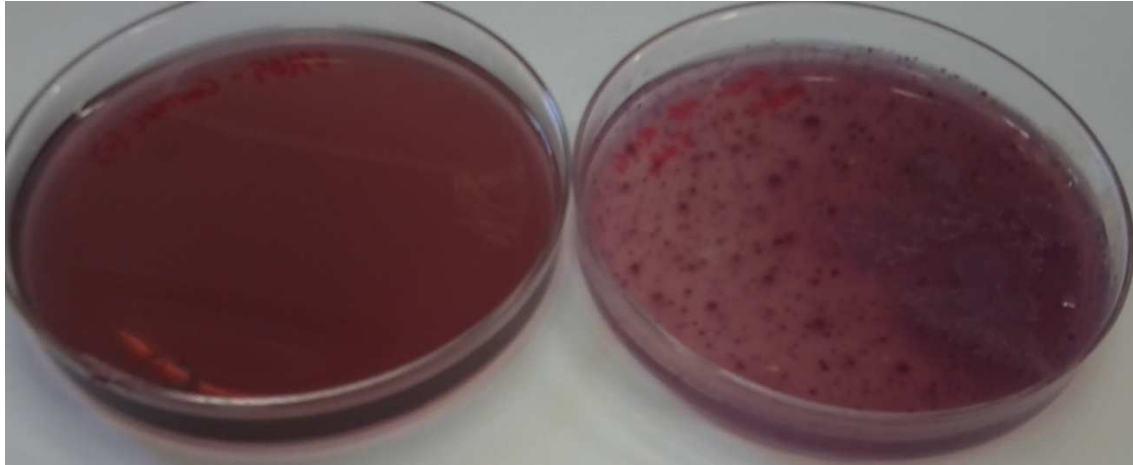
Tabla 6. Evolución de enterobacterias en carne de pollo y cerdo  
**Cerdo almacenado en cámara con equipo NCC**



**Gráfica 6.** Evolución de enterobacterias en carne de pollo.



**Gráfica 7 .** Evolución de enterobacterias en carne de cerdo.



**Figura 3.** Siembra negativa y siembra positiva de enterobacterias de muestras de pollo.

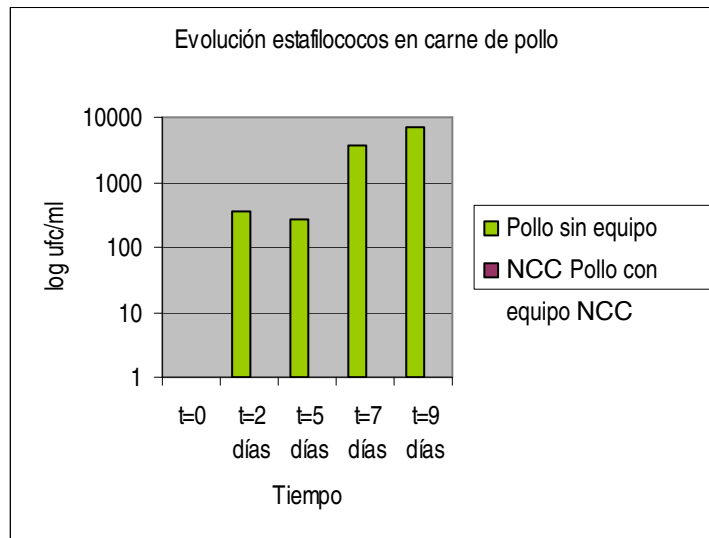
### ► **Estafilococcus coagulasa positiva**

Al inicio del estudio en ninguna muestra se detectaron estafilococos coagulasa positiva, manteniéndose este estado durante todo el estudio en los productos conservados en cámaras con equipos NCC. Los productos almacenados en las cámaras sin equipo NCC incrementaron progresivamente los niveles de estafilococos coagulasa positiva.

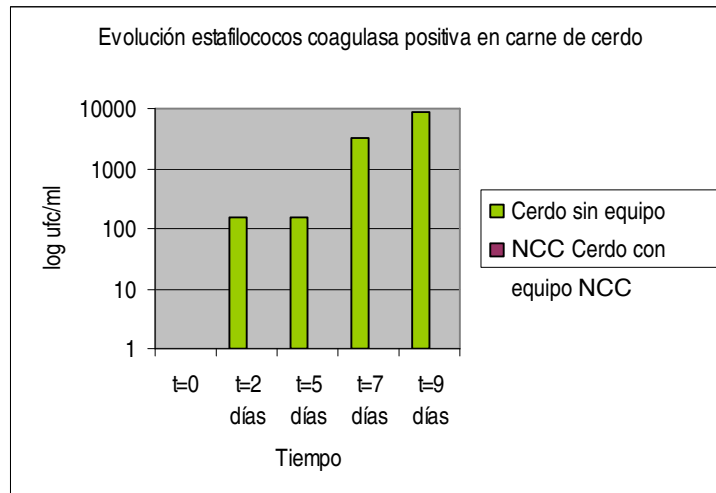
Muestra	Estafilococos coagulasa positiva				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
Pollo almacenado en cámara sin equipo NCC	<100 ufc/ml	350 ufc/ml	275 ufc/ml	3800 ufc/m	7000 ufc/m
Pollo almacenado en cámara con equipo NCC	<100 ufc/ml	<100 ufc/ml	<100 ufc/ml	<100 ufc/ml	<100 ufc/ml
Cerdo almacenado en cámara sin equipo NCC	<100 ufc/ml	150 ufc/ml	150 ufc/ml	3250 ufc/m	8650 ufc/m
Cerdo almacenado en cámara con equipo NCC	<100 ufc/ml	<100 ufc/m	<100 ufc/m	<100 ufc/ml	<100 ufc/ml

**Tabla 7.** Evolución de estafilococos en carne de pollo y cerdo.

**Cerdo almacenado en cámara con equipo NCC**



Gráfica 8. Evolución de estafilococos coagulasa positiva en carne de pollo



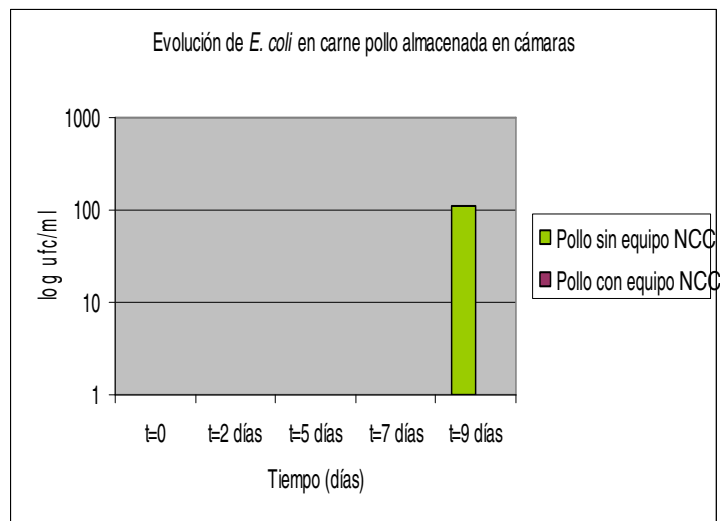
Gráfica 9 . Evolución de estafilococos coagulasa positiva en carne de cerdo.

### ➤ *Escherichia coli*

En las muestras de carne almacenadas en cámaras con equipos NCC no detectó la presencia de *E. coli* en ninguna de las muestras durante todo el estudio. En las muestras analizadas a tiempo 2 días, 5 días y 7 días tampoco se detectó la presencia de la bacteria al nivel de detección de la técnica utilizada hasta los 9 días se detectó la bacteria en los productos conservados en cámaras sin equipo NCC

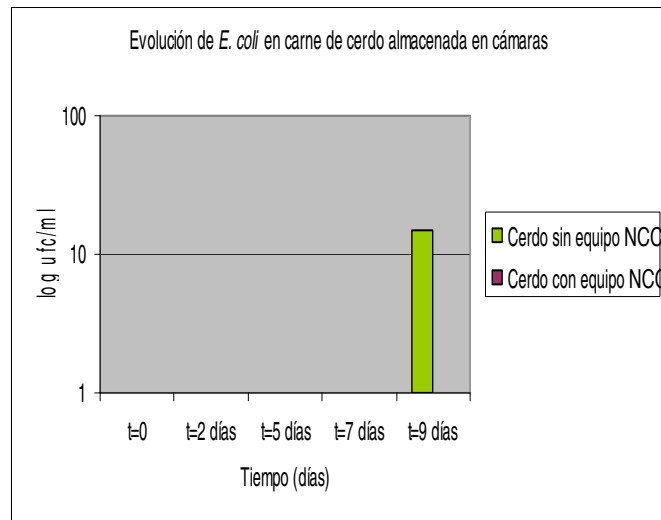
Muestra	<i>Escherichia coli</i>				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
Pollo almacenado en cámara sin equipo NCC	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<b>108 ufc/ml</b>
Pollo almacenado en cámara con equipo NCC	<10 ufc/ml	<10 ufc/m	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml
Cerdo almacenado en cámara sin equipo NCC	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<b>15 ufc/ml</b>
Cerdo almacenado en cámara con equipo NCC	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml	<10 ufc/ml

Tabla 8. Evolución de *E. coli* en carne de pollo y cerdo



Gráfica 10. Evolución de *E. coli* en carne de pollo





Gráfica 11 . Evolución de *E. coli* carne de cerdo.

### ► *Listeria monocytogenes*

La presencia de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria es un motivo de preocupación tanto para las Administraciones como para las organizaciones y las empresas alimentarias, ya que teniendo en cuentas las características de este microorganismo es difícil de eliminar. La legislación en la unión europea permite un límite de detección de 100 ufc/ml, pero este límite es inferior para alimentos destinados a población de riesgo en los que se exige ausencia del microorganismo, al igual que en otros países en los que la tolerancia es cero para esta bacteria en todos los productos independientemente del destinatario. Este criterio es muy difícil de conseguir por lo que las empresas se encuentran con un grave problema a la hora de exportar los productos que no cumplen con la norma. Teniendo en cuenta el Real Decreto 2073/2005, la presencia de *L. monocytogenes* estaría permitida en los alimentos objeto de este estudio ya que van a sufrir un proceso de cocinado durante el cual se elimina la bacteria y no constituye un peligro para el consumidor siempre que no sean población de riesgo. Los ensayos para la detección de la bacteria y comprobar el efecto bactericida del equipo NCC se hicieron mediante el proceso de investigación.

En el estudio realizado, la bacteria fue detectada en muestras de pollo almacenado en las cámaras sin equipo NCC a tiempo 2 días y a tiempo 9 días. El resto de muestras en todos los casos mostraron ausencia de la bacteria en 25g. No se puede concluir que la conservación de los productos en cámaras en las que hay instalados equipos NCC elimina la presencia de *L. monocytogenes*, pero sí se afirma que no se detecta la presencia de la bacteria en las cámaras con equipos NCC instalados, mientras que en el mismo producto almacenado en cámaras sin equipo NCC, sí se ha detectado la presencia del patógeno.

Muestra	<i>Listeria monocytogenes</i>				
	t=0	t=2 días	t=5 días	t=7 días	t=9 días
Pollo almacenado en cámara sin equipo NCC	Ausencia en 25 g	<b>Presencia en 25 g</b>	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	<b>Presencia en 25 g</b>
Pollo almacenado en cámara con equipo NCC	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
Cerdo almacenado en cámara sin equipo NCC	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g
Cerdo almacenado en cámara con equipo NCC	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g

Tabla 9. Investigación de *L. monocytogenes* en carne de pollo y cerdo.



Figura 4. Caldo Fraser muestras positivas carne de pollo

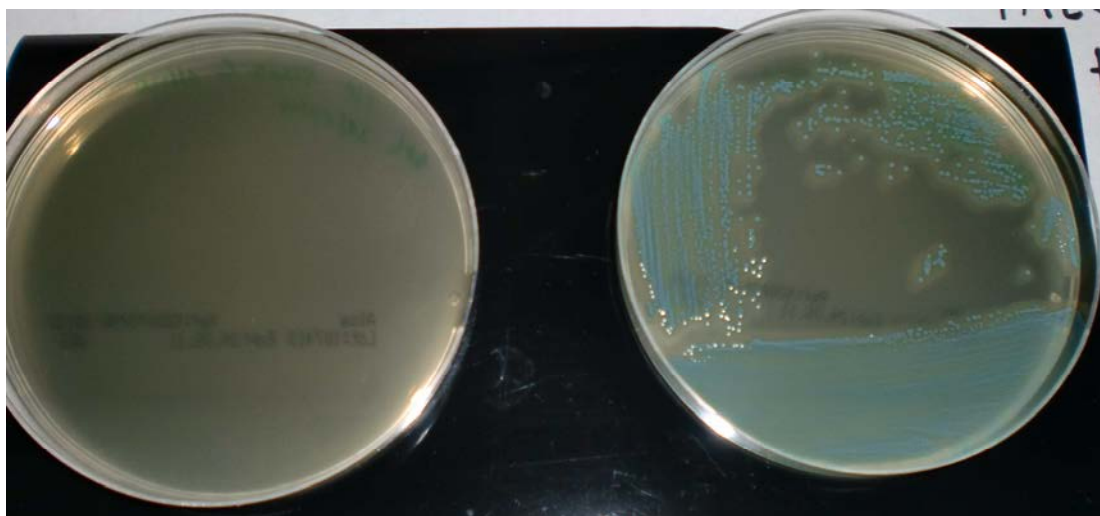


Figura 5. Siembra compass *Listeria* muestras positiva y negativa



**Figura 6.** Compass L mono confirm negativo

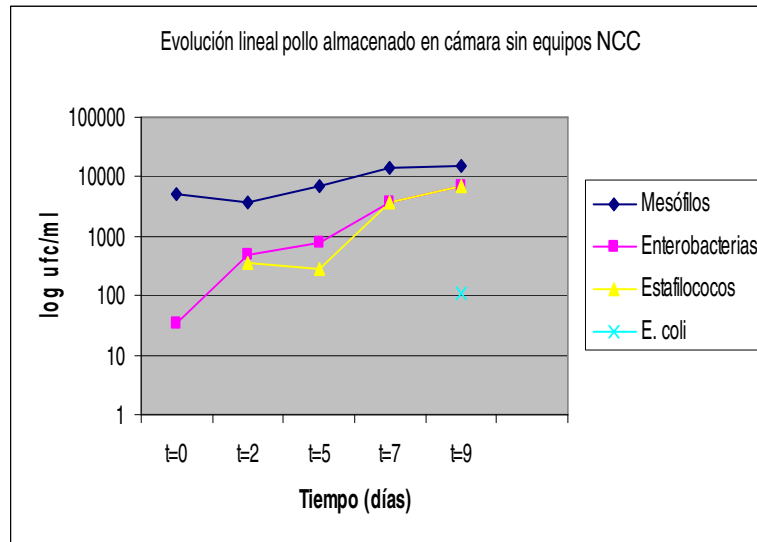


**Figura 7.** Compass L. mono confirm positivo

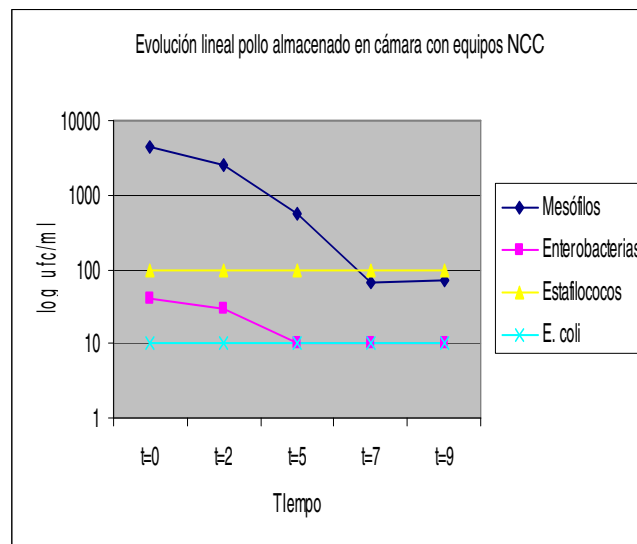
		Date:														
		Oxidase	Catalase	Latex Agglut.	Esculin	Mannitol	Xylose	Arabitol	Ribose	Rhamnose	Trehalose	Tagatose	Gluc-1-Phos	M-D-Gluc	M-D-Man	Haemolysis
Reaction																
Result					+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Reaction Index					4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions					4			5			4		7			
Octal Code:	4547															
Final Identification:	<i>L. monocytogenes</i>															

**Figura 8.** Galería de identificación bioquímica y resultado positivo *L. monocytogenes*

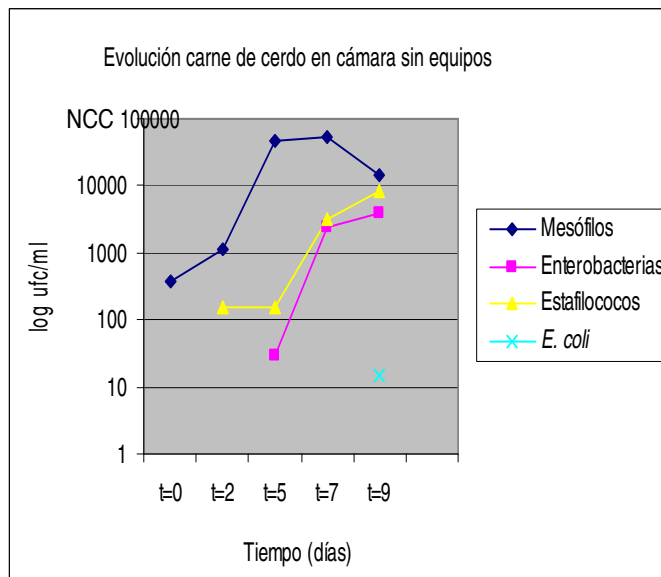
La evolución de los distintos microorganismos en las dos cámaras se puede observar en las siguientes gráficas.



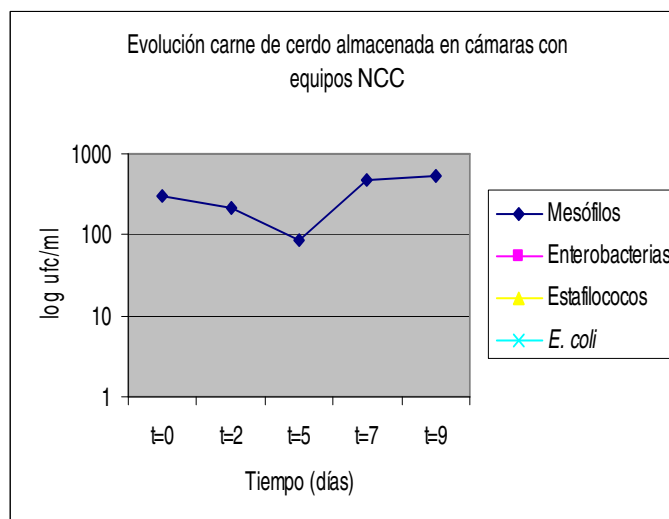
**Gráfica 12.** Evolución de los microorganismos en carne de pollo almacenados en cámaras sin equipos NCC



**Gráfica 13.** Evolución de los microorganismos en carne de cerdo almacenados en cámaras con equipos NCC



Gráfica 14. Evolución de los microorganismos en carne de cerdo almacenados en cámaras sin equipos NCC.



Gráfica 15. Evolución de los microorganismos en carne de cerdo almacenados en cámaras con equipos NCC.

La carne almacenada ha estado expuesta a la acción del aire, si protección ni sistema de envasado, con lo que se facilita la contaminación microbiana y se favorece la contaminación cruzada, sin embargo en las tablas de resultados se advierte un descenso en los recuentos de microorganismos en la cámara en la que se ha instalado el equipo NCC frente a la cámara en la que no se ha instalado, en la que se produce un incremento de los parámetros estudiados.

## 8. Conclusiones del estudio

1. Las cámaras objeto de este estudio se encuentran en condiciones higiénico-sanitarias óptimas para el almacenamiento de los productos y en condiciones similares para realizar análisis comparativos a lo largo del tiempo.
2. El equipo NCC mantiene el ambiente de la cámara en la que se instala purificado y libre de microorganismos que puedan intervenir en procesos de contaminación cruzada.
3. En la cámara con el equipo NCC instalado, se mantienen y/o reducen los recuentos de microorganismos mesófilos entre dos y tres logaritmos con respecto a la cámara en la que no hay instalados equipos NCC.
4. En la cámara con el equipo NCC instalado se mantiene y/o reduce el recuento de enterobacterias entre tres y cuatro logaritmos con respecto a la cámara en la que no hay instalados equipos NCC.
5. En la cámara con el equipo NCC instalado, se reducen los recuentos de estafilococos coagulasa positiva en tres logaritmos.
6. En la cámara con equipo NCC instalado no se produce el crecimiento de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasa positiva y el alimento seguro desde el punto de vista alimentario.
7. En los productos almacenados en la cámara con equipo NCC instalado no se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en ninguno de los análisis realizados.

## 9. Bibliografía

- AFNOR V 08-011. Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes. Techniques
- AFNOR V08-061.: Microbiologie des aliments. Dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfitoréductrices para comptage des colonies. Méthode de routine.
- Cañeque, V. y Sañudo, C. (2000). Metodología para el estudio de la canal y de la carne de rumiantes. Monografías INIA: Ganadería nº 1. Editado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología. Madrid. España.
- CIE (1976). Commission International de l' Eclairage. Committee TC.13. Proposal for study of color spaces and color differences equations. Journal of the optical society of America. 64. 896-897.
- Cowell, N.D. and Morisetti, M.D. 1969 J. Sci. Fd. Agric., 20:573.
- FIL-IDF 49. 1970. Méthode normalisée pour le dénombrement des germes totaux dans les
- FIL-IDF 61. 1971. Crèmes glacées et galces au lait. Dénombrement des germes totaux.
- Grau, R. y Hamm, R. (1953). Eine einfache methode zur bestimmung der wasserbindung in muskel. Naturwissenschaften. 40. 2-30.
- Honikel, K.O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristic of meat. Meat Science. 49 (4). 447-457.
- ISO 21528-1:2004.
- ISO 5944 / IDF 60. Décembre 2001. Lait et produits à base de lait. Détection des staphylocoques à coagulase positive. Technique du nombre le plus probable.
- ISO 6887
- ISO 8261. ISO/TS 11133-2:2003
- J.O. du 27 août 1963. Contrôle des laits concentrés sucrés et des laits secs. 1960. Standard l'Agriculture. Commission XXX. Cosmétologie.
- Mengaud, J. Braun-Breton, C. y Cossart, P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific Méthode de routine.
- Méthode officielle pour le dénombrement des germes aérobies mésophiles. Ministère de methods for the examination of dairy products. 11th ed., APHA Inc., New York.
- Mossel, Eelderink, Koopmans and van Rossem. 1978. Lab Practice 27:1049
- Mossel, Eelderink, Koopmans and van Rossem. 1979. J. Food Protect. 42:470.
- NF EN ISO 16140 (V 08-103). Octobre 2003. Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives. *Staphylocoques* à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 2: Technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène.
- NF EN ISO 6888-2 (V 08-014-2). Octobre 1999. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des par comptage des colonies obtenues a 30°C.
- NF EN ISO 6888-2/A1 (V 08-014-2/A1). Décembre 2003. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces). Partie 2: Technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène. Amendement 1 : Inclusion des données de fidélité.
- NF V 08-057-1. Janvier 2004 (2 e tirage de Décembre 2004). Microbiologie des aliments. Méthode de routine pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C. Partie 1: Technique avec confirmation des colonies.
- Renerre, M. (1981). La couleur de la viande et sa mesure. Vlande et produits carnés. 2. 10-16.
- XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.
- XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

El trabajo fue realizado siguiendo las normas de calidad y según las buenas prácticas de laboratorio.

Juan Carlos Racero Vallés  
Gerente

Teresa Quesada Martínez  
Responsable de laboratorio

En Cortegana a 18 de Agosto de 2011