



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo fin de grado

**MEJORA DE LA COMPOSICIÓN DE LA SALMUERA PARA PROLONGAR LA
VIDA ÚTIL DE LA CARNE DE AVE MARINADA**

**IMPROVEMENT OF BRINE COMPOSITION TO PROLONG THE SHELF LIFE
OF MARINATED POULTRY MEAT**

Autor

Julio Sánchez Perales

Directores

Santiago Condón Usón y Virginia Ruiz Artiga

Facultad de Veterinaria

2020

Índice

1. Resumen/abstract.....	3
2. Introducción.....	4
2.1 Importancia económica.....	4
2.2 Deterioro del pollo y vida útil.....	5
2.3 Patógenos vehiculados por la carne de pollo.....	6
2.4 Procesado del pollo.....	7
3. Justificación y objetivos.....	9
4. Materiales y métodos.....	10
4.1 Materia prima.....	10
4.2 Evolución de la vida útil.....	10
4.2.1 Análisis microbiológico.....	10
4.2.2 Análisis fisicoquímico.....	11
4.2.3 Análisis sensorial.....	12
4.2.4 Evaluación de la vida útil de piezas obtenidas en distintas fases del procesado.....	12
4.3 Efecto antimicrobiano de distintas salmueras.....	13
5. Resultados.....	14
5.1 Alteración de la carne de ave durante su almacenamiento.....	14
5.1.1 Evolución de las características microbiológicas, físico-químicas y sensoriales de la carne de pollo almacenada en refrigeración.....	14
5.1.1.1 Análisis microbiológico.....	14
5.1.1.2 Análisis fisicoquímico.....	16
5.1.1.3 Análisis sensorial.....	17
5.1.2 Evolución de la alteración en distintas zonas de contramuslo de pollo.....	19
5.1.2.1 Análisis microbiológico.....	19
5.1.2.2 Análisis fisicoquímico.....	20
5.1.3 Evolución de la alteración de la carne de pollo antes y después de salmuerizar.....	21
5.1.3.1 Análisis microbiológico.....	21
5.1.3.2 Análisis fisicoquímico.....	22
5.1.4 Estabilidad de la carne de pollo en distintos puntos de la cadena productiva.....	23

5.1.4.1	Análisis microbiológico.....	23
5.1.4.2	Análisis fisicoquímico.....	24
5.2	Efecto antimicrobiano de las salmueras.....	26
6.	Discusión.....	28
6.1	Alteración de la carne de ave.....	28
6.2	Efecto antimicrobiano de las salmueras.....	30
7.	Conclusión.....	31
8.	Bibliografía.....	32

1. Resumen

La producción de carne a nivel mundial prácticamente se ha duplicado desde el año 2000 siendo el pollo uno de los de mayor crecimiento. Sin embargo, ésta es la materia prima más perecedera (6 días) y que más asociada está a enfermedades (campilobacteriosis y salmonelosis). Este trabajo se plantea para conocer la vida útil del pollo y cómo evoluciona su deterioro. Se utilizaron distintas técnicas para prolongar la vida útil manteniendo las debidas garantías sanitarias. A las muestras de pollo con salmuera y sin salmuera se les hizo: análisis microbiológico que determino que la salmuera prolongaba 2 días la vida útil. Análisis fisicoquímico (NBVT) que es un parámetro muy usado para medir el deterioro del pescado, pero no fue relevante en el estudio del pollo. Y en cuanto al análisis sensorial se cuantificó la carga microbiana limite, a partir del cual, el producto es rechazado por el consumidor. Se concluyó que a partir de 8,7 Log₁₀ UFC/g en el recuento de microorganismos mesófilos y psicrótrofos el producto era rechazado. Se constato que incorporando aceites esenciales como el alil-isocianato a partir de 500 ppm se inhibe el crecimiento en placa durante al menos 6 días. También se experimentó con lactato sódico, resultando que incorporando 40 g/L inhibía el crecimiento en placa hasta el cuarto día.

Abstract

Meat production worldwide has practically doubled since 2000, with chicken meat being one of the fastest growing. However, is the most perishable raw material (6 days) and asociated to diseases (Campylobacteriosis and Salmonellosis). This work is presented to acknowledge its shelf life and worsening. Different techniques were used to prolong its shelf life taking account of the sanitary measurements. We had two samples, raw chicken and brined chicken. These are some of the experiments we made: microbiological analysis that determined brined chicken lastest 2 more days, physicochemical analysis (NBVT) which is a parameter used in fish deterioration which eventually had no relevance. Lastly, sensorial analysis showed in which amount of microbial load the consumer wouldnt accept the product. We came to the conclusion that the product was rejected if the mesophilic and psychrotrophic microorganisms were up to 8,7 Log₁₀ UFC/g. We verified that adding essential oils like alil-isocianato inhibited the growth of the microorganisms in the Petri dish for almost 6 days. Moreover, we experimented with sodium lactate making the conclusion that adding 40g/L inhibited the growth of microorganisms in the petri dish for 4 days.

2. Introducción

2.1 Importancia económica.

Desde un punto de vista nutricional la importancia de la carne se debe a su alta calidad proteica, al contenido de aminoácidos esenciales, de minerales y de vitaminas altamente disponibles. En particular la carne de pollo es una de las carnes más comercializadas y consumidas a nivel mundial (Wang et al., 2017). De hecho, es la segunda más consumida en el mundo después de la carne de cerdo. Además, su consumo está creciendo cada año debido a que es una carne barata y saludable y a que, a diferencia de la de cerdo, no está afectada por ningún tabú religioso. En la Figura 1 se observan los diferentes consumos per cápita de distintas carnes en diferentes regiones. Europa es la mayor consumidora de carne de aves seguida de América del norte.

Según la “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (FAO) el consumo medio per cápita es de 44 kg (FAO, 2019). Sin embargo, el consumo de productos cárnicos en América y Europa es más elevado ya que superan los 60 kg per cápita. El del resto del mundo es inferior a 35 kg, esto se asocia al nivel económico de los distintos continentes y a la cultura de cada uno de ellos (OECD, 2018).

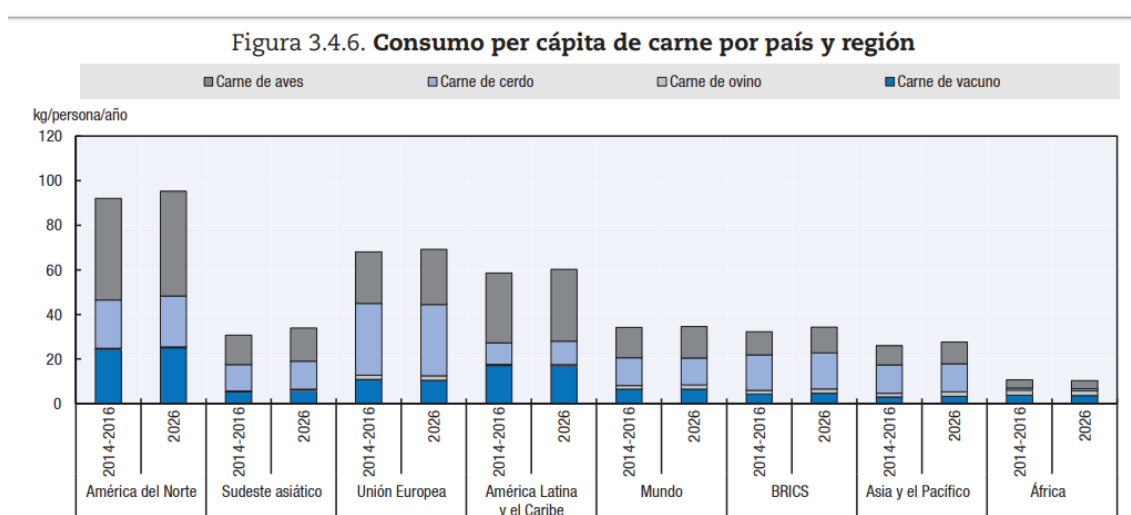


Figura 1. Consumo de distintas carnes en el mundo (OECD, 2018).

La producción de carne de pollo a nivel mundial en 2018 fue de 95,5 millones de toneladas con un crecimiento del 2,02% respecto a 2017. Entre los principales países productores destacan EEUU, Brasil, la UE y China (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (MAPAMA), 2019).

A nivel de la UE, España ocupa el 5º lugar en producción de carne de ave, por detrás de Polonia, Reino Unido, Francia y Alemania. En el conjunto de la UE, en el año 2017 aumentó la producción de carne de ave, alcanzándose los 15,4 millones de toneladas.

En España, en 2018, se sacrificaron un total de 790.278 aves (aumento del +4,75% respecto 2017), mientras que se alcanzaron 1.624.794 toneladas totales, lo que supone un ascenso del 6,27% respecto a 2017 (MAPAMA, 2019).

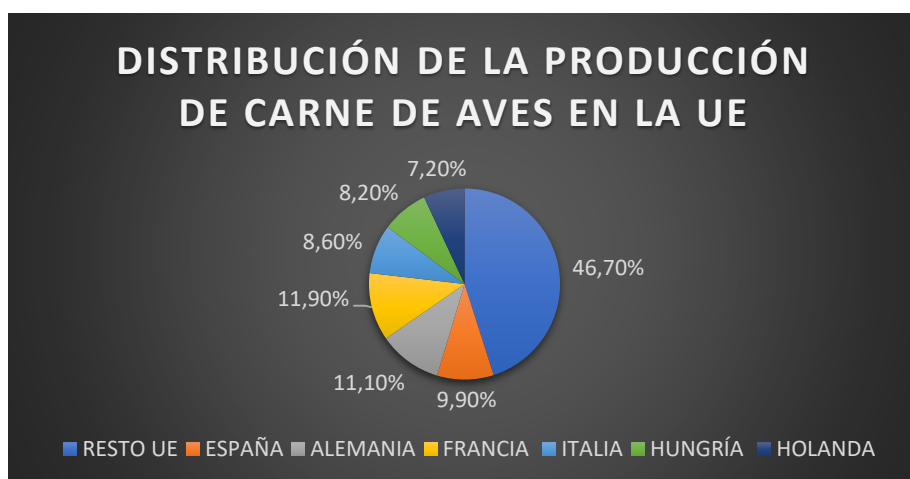


Figura 2 Distribución de carnes de aves en la Unión Europea. (Figura adaptada del MAPAMA, 2019).

2.2 Deterioro del pollo y vida útil.

La mayoría de los estudios al respecto (Wang et al., 2017), (Joseph et al., 2020) indican que los microorganismos que con mayor frecuencia deterioran la carne de pollo en refrigeración son: *Pseudomonas spp.*, diversas enterobacterias, *bacterias ácido lácticas* y *Brochotrix thermosphacta*. Sin embargo, otros estudios (Wang et al., 2017) sostienen que hay microorganismos con gran actividad catabólica en carne de pollo refrigerada, que destruyen la estructura de las células, liberando así los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias nombradas anteriormente. Estos estudios encontraron que *Aeromona Salmonicida* tenía la mayor actividad proteolítica sobre las proteínas miofibrilares, lo cual permitía un crecimiento exponencial de *Pseudomona fragi*, provocando un aumento rápido del NBVT (Nitrógeno Básico Volátil Total), la modificación del pH, la aparición de olores extraños y la formación de limo superficial (Wang et al., 2017).

La vida útil de la carne de pollo es muy corta, alrededor de 5-6 días en refrigeración, por lo que se debe manipular lo menos posible y el producto debe llegar cuanto antes al consumidor.

Los factores responsables de que la carne de pollo se deteriore tan pronto son: el alto contenido en nutrientes disponibles para los microorganismos, la alta actividad de agua, un pH de 4,6 o superior, la presencia de enzimas autolíticas y la presencia de lípidos que favorecen la oxidación (Joseph et al., 2020).

Se asume que el tejido muscular en animales vivo sanos es prácticamente estéril, así que la carga microbiana y la composición de la carne fresca está influenciada por el estado fisiológico del animal antes del sacrificio, la propagación de microorganismos durante el sacrificio, el entorno del matadero y la eliminación de los despojos y la carcasa. En opinión de algunos autores (Joseph et al., 2020) este último es el factor principal determinante de la carga microbiana final de estos productos.

2.3 Patógenos vehiculados por la carne de pollo.

Además de la flora alterante, la carne de las aves también puede vehicular especies microbianas patógenas para el hombre. Los cuatro géneros que se consideran más problemáticos para la salud pública en este producto son: *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Los servicios gubernamentales de salud consideran como riesgos adicionales: la posible aparición de nuevos patógenos, la posible presencia de patógenos oportunistas y la posibilidad de que los microorganismos desarrollen resistencia a los antibióticos (Clelia, 2017).

De estos tres riesgos, el más importante es, sin duda, la aparición de resistencias a antibióticos, ya que hay muchos estudios que demuestran que la aparición de esta resistencia es frecuente, y que se propaga rápidamente, incluso entre especies (Clelia, 2017). Un estudio sobre la antibiótico-resistencia de *P. aeruginosa*, uno de los principales microorganismos que deterioran el pollo, demostró que un 17% de las cepas aisladas eran resistentes contra tres o más antibióticos, y que un 6% de las cepas resistían todos los antibióticos indicados para su tratamiento (Clelia, 2017).

La industria avícola está integrada verticalmente por lo que el control del problema debe comenzar desde el nacimiento hasta el sacrificio, pasando por el proceso de cría, transporte y procesado en planta. Este control representa un gran esfuerzo que pretende garantizar la seguridad del consumidor, pese a lo cual, según el Servicio de Inspección de Seguridad Alimentaria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-FSIS), la carne de pollo aparece dos veces en la lista de los diez alimentos que producen mayor número de toxiinfecciones alimentarias. El alimento aparece relacionado en la lista con campilobacteriosis

y con salmonelosis. Además, recientemente la producción de carne de pollo estaba muy ligada al consumo de piensos medicados lo que ligaba a esta carne al problema de las antibiótico-resistencias. En la actualidad se está realizando un notable esfuerzo para desarrollar e implementar el uso de antimicrobianos naturales como alternativa al uso de antibióticos (Taylor, 2015).

2.4 Procesado del pollo.

Aunque todavía el consumo de canales de aves es mayoritario, la tendencia actual es a aumentar el consumo de elaborados cárnicos, bien comercializando la carne troceada/fileteada cruda, adobada/marinada, o bien picada en forma de salchichas cocidas o hamburguesas crudas. Los productos marinados están aumentando especialmente, porque el proceso mejora la calidad sensorial de la carne y permite introducir nuevos productos en el mercado. Sin embargo, el marinado está cuestionado dado que puede ser fuente de contaminación adicional del producto, aunque, realizado adecuadamente, puede retrasar el deterioro y reducir los microorganismos patógenos (Lytou et al., 2020). La figura 3 muestra un esquema del proceso típico de elaboración de la carne de ave marinada/salmuerizada (Línea de producción de Aldelis S.L.).

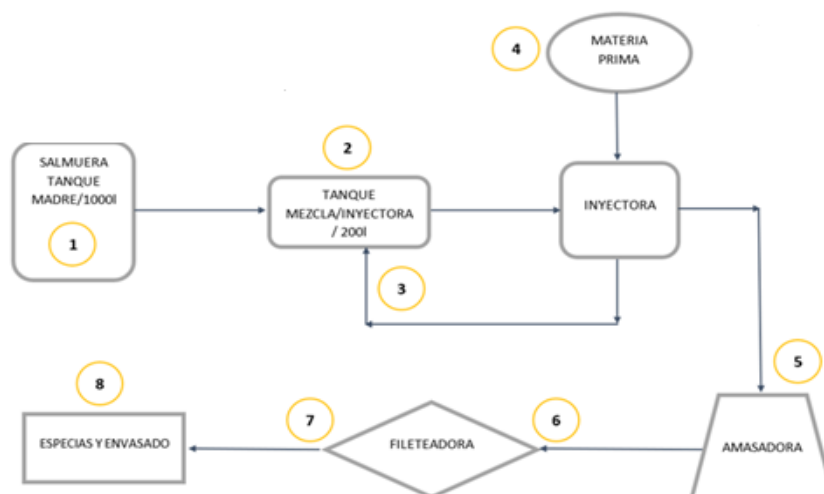


Figura 3 Línea de producción de contramuslo de pollo. (Línea de producción de Aldelis S.L.).

Tras el sacrificio, pelado, eviscerado, despique y su posterior enfriado, la carne en piezas llega a la nave de procesado para elaborar los filetes salmuerizados. La línea consta de un tanque madre

de salmuera conectado a un tanque más pequeño que alimenta la inyectora y recoge el excedente de salmuera tras ser inoculada. Tras la inyección de la salmuera las piezas pasan a una amasadora dinámica y a vacío que permite distribuir uniformemente la salmuera por toda la pieza de carne. Posteriormente, pasa a la fileteadora y por último se añaden las especias y se envasa (Fig. 3). Los números incluidos en el esquema permiten identificar los puntos de muestreo para el análisis de contaminación de la línea.

La salmuera puede ser de composición muy variada en función de los objetivos perseguidos, pero esencialmente su uso pretende mejorar las propiedades organolépticas del producto y prolongar su vida útil. Normalmente contiene combinaciones de azúcares, sal, ácidos débiles (ácido acético, cítrico y láctico), especias, orégano, ajo..., aditivos -xantana y goma guar-, conservantes -sorbatos, benzoatos...- y potenciadores de aroma (Smaoui, Ben Hlima y Ghorbel, 2012). La sal es el ingrediente principal de la salmuera pues mejora las propiedades organolépticas del producto, aumenta la retención de agua, actúa sinérgicamente con el trifosfato de sodio para extraer las sales solubles de las fibras proteicas, e inhibe el crecimiento de los microorganismos (Alvarado y McKee, 2007).

Hoy en día se están buscando y evaluando diversos antimicrobianos naturales, tales como el thymol o el carvacrol, como aditivos alimentarios con el fin de alargar la vida útil e higienizar estos productos (Smaoui, Ben Hlima y Ghorbel, 2012)

3. Justificación y objetivos

Este trabajo surge de la necesidad actual de prolongar la vida útil de la carne de ave, ya que son muchos los empresarios que tienen muy poco margen de tiempo para colocar el producto en los mercados globalizados; además, prolongar la vida útil ayudará a reducir la cantidad de desperdicios que constituye otro de los grandes problemas de la industria agroalimentaria. Igualmente, según hemos indicado en la introducción, mejorar la estabilidad de estos productos seguramente ayudará a minimizar la concentración de especies patógenas y por tanto a mejorar la salud pública.

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar la alteración de la carne de ave de la empresa Aldelis S.L. (Zaragoza, España), evaluar el efecto de las salmueras actualmente utilizadas, y explorar nuevos componentes que permitan prolongar la vida útil de sus productos marinados. Para la consecución de este objetivo se consideró necesario desarrollar las siguientes actividades:

- Caracterizar la alteración de la carne objeto de estudio, sus causas y su cinética.
- Evaluar el efecto de la salmuera en la vida útil del producto.
- Evaluar la eficacia bacteriostática/bactericida de distintos antimicrobianos en la salmuera.

4. Materiales y métodos

4.1 Materia prima.

La materia prima utilizada para esta investigación fue gentilmente suministrada por la empresa Aldelis S.L. Para caracterizar la alteración se utilizaron trozos congelados en el matadero de origen (-20°C) que, como paso previo a su uso, se descongelaron en una cámara fría (4°C) durante 12 horas. Para estudiar los posibles efectos de las diferentes operaciones de procesado se utilizaron trozos de contramuslo de pollo que se tomaron en distintos puntos de la cadena de producción y se mantuvieron en congelación hasta el momento de su análisis. La salmuera también fue suministrada por la empresa Aldelis S.L. el procedimiento fue el mismo que con el pollo congelación en origen a -20°C. La composición de la salmuera es 87,13% de H₂O, 4,44% de sal, 3,47% de preparado A (preparado aromatizante) y un 4,97% de preparado B (3,47% entre acetato de sodio y lactato sódico, 0,74% de carbonato sódico y 0,74% de ajo).

4.2 Evaluación de la vida útil.

Uno de los problemas más graves que conlleva este tipo de estudios es establecer el tiempo de vida útil con razonable precisión, lo que exige determinar el parámetro responsable del rechazo del consumidor, y establecer el método de medida de la calidad con su límite mínimo/máximo. Para decidir el método más adecuado optamos por realizar análisis físico-químicos, microbiológicos y sensoriales.

4.2.1 Análisis microbiológico.

Para la preparación de las muestras y la realización de las diluciones se usó la metodología oficial de la ISO 6887-1,2017 (UNE-EN ISO 6887-1, 2017). En resumen, la técnica consistía en: pesar una cantidad de pollo mayor de 10 gramos y triturarla con la batidora. Después se añaden 10 gramos del pollo triturado, 100 g de agua de peptona al 0,1% y se lleva al stomacher durante 1 minuto para homogenizar la muestra. La bolsa de stomacher es la disolución madre, con la que se hacen el resto de diluciones, añadiendo a un eppendorf 9 ml de agua de peptona 0,1% y 1 ml de disolución madre, y así sucesivamente, de forma que en cada trasvase se reduce un ciclo logarítmico de carga microbiana. Luego se procede a sembrar con la técnica de siembra en masa la dilución considerada y se lleva a incubar a las estufas a distintas temperaturas dependiendo el microorganismo. Los microorganismos que se estudiaron en este proyecto fueron: microorganismos psicrótrofos, mesófilos, *Pseudomonas spp* y enterobacterias.

Para el análisis de Psicrótrofos y mesófilos totales se siguieron las normas (UNE-EN ISO 4833-1, 2014, UNE-EN ISO 4833-2, 2014) respectivamente. En resumen, en ambas se usó el medio de cultivo TSA (OXOID). Los microorganismos psicrótrofos se incuban a 7°C durante 10 días mientras que los mesófilos se cultivan a 30°C durante 24/48h.

Para el análisis de Pseudomonas(UNE-EN ISO 13720, 2011), se utiliza el medio de cultivo GSP(OXOID) y se incuba a 37°C 24/48h.

Las enterobacterias se determinaron siguiendo las normas (UNE-EN ISO 21528-1, 2018, UNE-EN ISO 21528-2, 2018) sembrando en el medio de cultivo VRBG (OXOID) y se incuba a 37°C durante 48/72 h.

4.2.2 Análisis fisicoquímicos.

Una vez revisada la bibliografía se optó por analizar el pH, el nitrógeno básico volátil total (NBVT) y la acidez.

Para medir el pH se utilizó un pH-metro de punción portátil (XS, modelo PH7). El valor se calculó como la media de tres mediciones efectuada en distintas partes de cada muestra. Antes de cada sesión de análisis el pH-metro se calibró con tampones de referencia siguiendo las indicaciones del fabricante.

El NBVT es una técnica de análisis fisicoquímico muy utilizada en pescados para medir el grado de deterioro, pero escasamente utilizada en carnes. Decidimos introducir este análisis porque, según hemos indicado previamente, la actividad metabólica de las *pseudomonas*, uno de los grupos más frecuentemente implicados en la alteración de la carne de aves (Wang et al., 2017), genera una alta y rápida concentración de NBVT. Para determinarlo se usó el método oficial de la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) (AOAC, 2020). En resumen, el método consiste en pesar 2 g muestra en un tubo falcon en la balanza analítica, añadirle 20 ml de ácido perclórico al 6%, triturar la muestra con un ultraturrax y centrifugar las muestras 5 minutos a 3000 r.p.m. Tras la centrifugación se procede a verter el sobrenadante en tubos grandes de vidrio donde se va a realizar el destilado. Además, se le añade 3 gotas de fenolftaleína. Para el destilado se programaba el equipo para que usará 10 ml de NaOH al 5%. El destilado se recoge en erlenmeyers a los que se les ha añadido 20 ml de ácido bórico al 3 % y 3 gotas de tachiro. Por último, se valora el destilado con HCL 0,1N.

La actividad microbiana suele producir acidificaciones por la degradación de los azúcares, que suele ser el metabolismo más rápido, y alcalinización por degradación de las proteínas, lo que

nos indujo a introducir en la matriz experimental la determinación de la acidez de la carne como posible parámetro indicador de la calidad. Para realizar estos análisis se utilizó el método oficial de la AOAC con pequeñas variaciones según describen Gayán y col. (2012). En resumen, el método consistía en triturar 25 g de pollo en 75 ml de agua destilada, diluir 1/10, también en agua destilada, y neutralizar la solución con hidróxido sódico 0,1N (Panreac, España) hasta alcanzar un pH de 8,2. Cada muestra se analizó por triplicado.

4.2.3 Análisis sensoriales.

Para el análisis sensorial se emplearon 9 catadores que evaluaban positiva o negativamente la aceptabilidad de la pieza en función de la intención de compra. Dado que estudios previos (Maya, 2012) demostraban que la calidad sensorial que más rápidamente se perdía era el olor, se pidió a los catadores que evaluaran únicamente esta característica. No se evaluaron otros parámetros, como por ejemplo el aspecto externo, ya que al ser trozos irregulares había mucha variabilidad entre las muestras. Los análisis se realizaron depositando las piezas por separado en platos y dejándolas reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente para airearlas. Posteriormente los catadores actuaron separadamente decidiendo únicamente si, tomando como base el olor, las piezas eran organolépticamente aceptables o no. Estas catas se realizaron a partir del tercer día de almacenamiento en los estudios de vida útil y se mantuvieron hasta el día en que todos los catadores valoraron las piezas negativamente.

4.2.4 Evaluación de la vida útil de piezas obtenidas en distintas fases del procesado.

Los estudios de vida útil se realizaron almacenando piezas de 12 ± 2 gramos en recipientes plásticos de 100 ml de volumen que se incubaron a 7°C durante 10 días. A periodos predeterminados de tiempo se extrajeron las muestras y se analizaron según se ha descrito en apartados anteriores. Estos estudios se realizaron por fases según se describe a continuación.

Se realizó un primer estudio de la vida útil de trozos de pollo con el fin de establecer una aproximación a la cinética de alteración y, sobre todo, para ver las relaciones entre los distintos parámetros analizados. El objetivo último era seleccionar el parámetro predictivo más adecuado y establecer los valores máximos admisibles. En este primer estudio se hizo un análisis microbiológico de mesófilos, psicrótrofos, pseudomonas y enterobacterias a lo largo de toda la vida útil; el análisis químico-físico del NBVT y del pH; y también se hizo un análisis sensorial.

En un segundo estudio se estableció la vida útil de contramuslo de pollo muestreado justo antes de la salmuerización en la propia línea de producción de la empresa. En este estudio se comparó

la estabilidad de las zonas inferior (A) y superior del hueso (B) de una misma pieza. En este estudio se analizaron los psicrótrofos y mesófilos totales, el NBVT y el pH.

Se realizó un tercer estudio para comparar la evolución durante el almacenamiento de piezas antes y después de la inoculación de la salmuera. Además, en este experimente se hizo especial hincapié es el estudio de la variabilidad interpiezas por lo que se realizó por cuadruplicado. A lo largo del almacenamiento se estudiaron los mesófilos y psicrótrofos totales, el NBVT y la acidez.

En el cuarto y último estudio se investigó la evolución de los recuentos de mesófilos y psicrótrofos totales, del NBVT y de la acidez de piezas de contramuslo de pollo obtenidas en distintos puntos de la línea de procesamiento de la empresa. Se pretendía determinar los principales focos de contaminación del producto y por tanto los puntos más adecuados para mejorar el proceso. La primera muestra de carne se extrajo justo antes de la entrada en la inyectora de salmuera (P4; Fig. 3); la segunda antes de la entrada en la fileteadora (P6; Fig.3); la tercera tras el fileteado (P7; Fig.3); y la cuarta tras la adición de las especias y el envasado. (P8; Fig.3).

4.3 Efecto antimicrobiano de distintas salmueras.

Del análisis de la cadena de producción y de los resultados de las actividades anteriores se deducía que previsiblemente la inoculación de la salmuera en la masa de la carne podría constituir uno de los puntos críticos de contaminación del producto, y además la eficacia bacteriostática/ bactericida de los componentes de la salmuera podrían determinar en buena medida su vida útil. Por estos motivos decidimos estudiar el efecto bactericida de la salmuera. Habitualmente estos estudios se realizan en medios de cultivo líquidos enriquecidos con distintas concentraciones del antimicrobiano objeto de estudio. Determinando por turbidez en un tiempo fijo de incubación el crecimiento/no crecimiento puede calcularse la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del compuesto, y por recuentos en placa la Concentración Mínima Bactericida (CMB). En este trabajo, dada la naturaleza del alimento estudiado decidimos, para aproximarnos a la situación real, utilizar una metodología alternativa basada en el crecimiento en medios sólidos. El método experimental seguido consiste en inocular TSA fundido con distintas concentraciones de salmuera, inocular un cultivo en fase estacionaria de un microorganismo aislado de la carne alterada, a una concentración de 1000 UFC/placa y verter la mezcla en placas de Petri. A lo largo de la incubación a 30°C se realizan recuentos de las colonias para determinar la CMI. Se estudió la eficacia del lactato sódico y se exploró la del alil-isocianato.

5.Resultados

5.1. Alteración de la carne de ave durante su almacenamiento.

5.1.1 Evolución de las características microbiológicas, físico-químicas y sensoriales de la carne de pollo almacenada en refrigeración.

5.1.1.1 Análisis microbiológico.

Se realizaron los análisis microbiológicos de mesófilos (fig.4), psicrótrofos, (Fig.5), enterobacterias (Fig. 6) y *pseudomonas* (Fig. 7) con 7 muestras distintas de trozos de pollo. Como se observa en la figura 4 la carga inicial de las muestras es de 4 Log₁₀ UFC/g y alcanza a los 6 días una carga de 10 Log₁₀ UFC/g. Pero la curva exponencial se da desde el día 0 hasta el día 4 que alcanza las 9 Log₁₀ UFC/g. En el caso de los psicrótrofos (Fig.5) la gráfica es idéntica a los mesófilos. En cambio, para los diferentes grupos microbiológicos: *Pseudomonas* (Fig.6) y enterobacterias (Fig.7) sí que se observaron diferencias; en las *Pseudomonas* la carga inicial microbiana fue de 2 Log₁₀ UFC/g, inferior a la de mesófilos y psicrótrofos, pero igual que la de enterobacterias. Las *Pseudomonas* mantienen un crecimiento exponencial hasta los 6 días del experimento y a partir de ahí se produce la fase estacionaria donde llegan a alcanzar una media de 9,4 Log₁₀ UFC/g a los 8 días de vida útil. Sin embargo, las enterobacterias tienen un crecimiento exponencial hasta el día 4 y a partir de ahí entran en fase estacionaria y alcanzan una media de 7,4 Log₁₀ UFC/g.

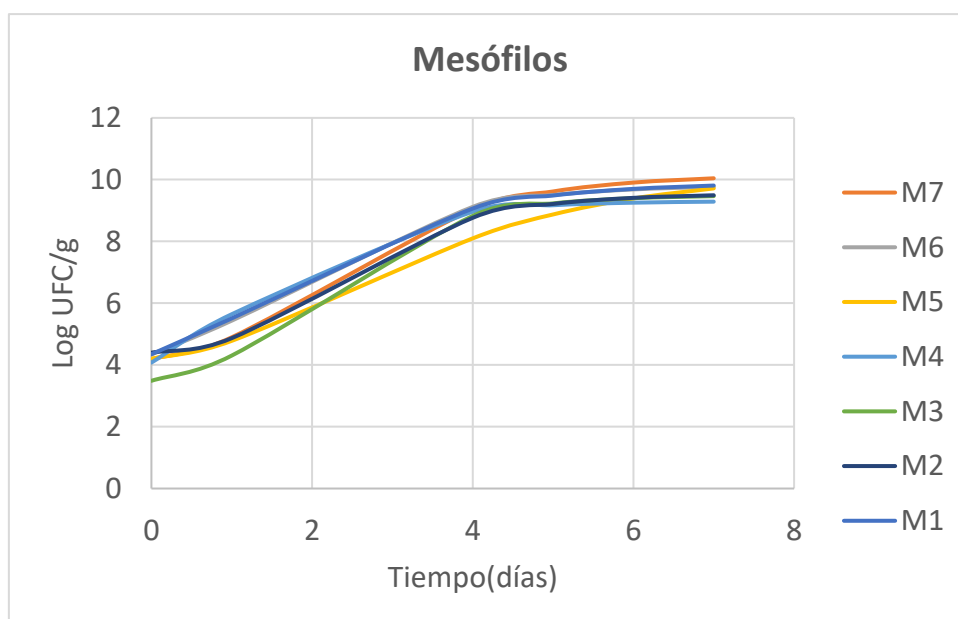


Figura 4 Recuento microbiológico de mesófilos en recortes de pollo sin salmuera.

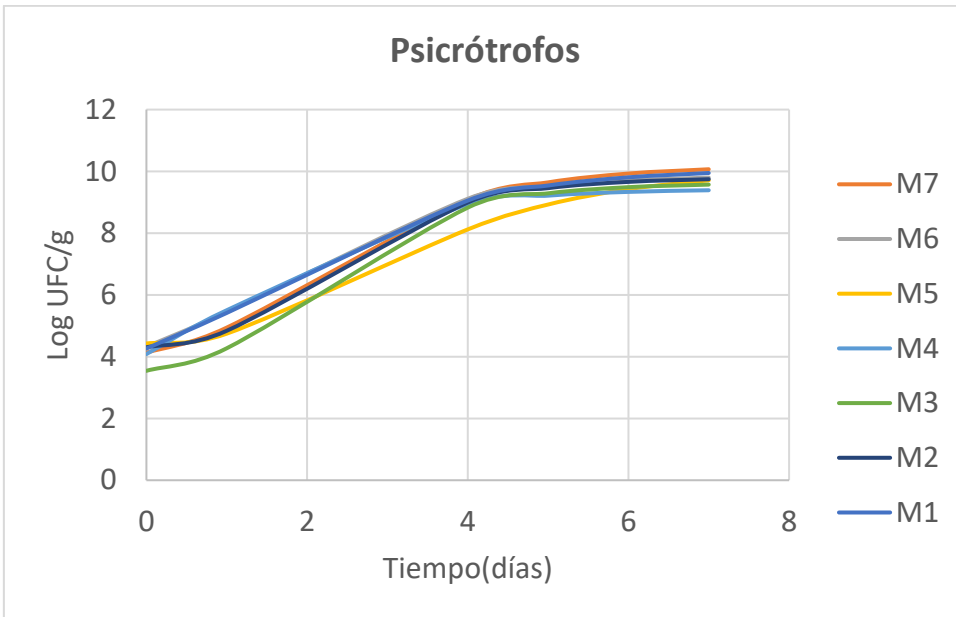


Figura 5 Recuento microbiológico de psicrótrofos en recortes de pollo sin salmuera.

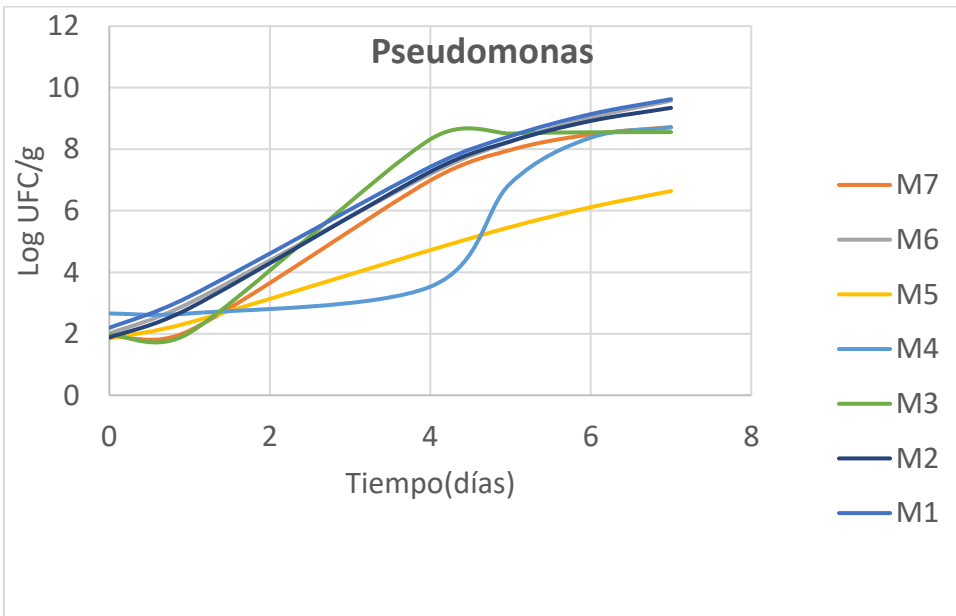


Figura 6 Recuento microbiológico de *Pseudomonas spp* en recortes de pollo sin salmuera.

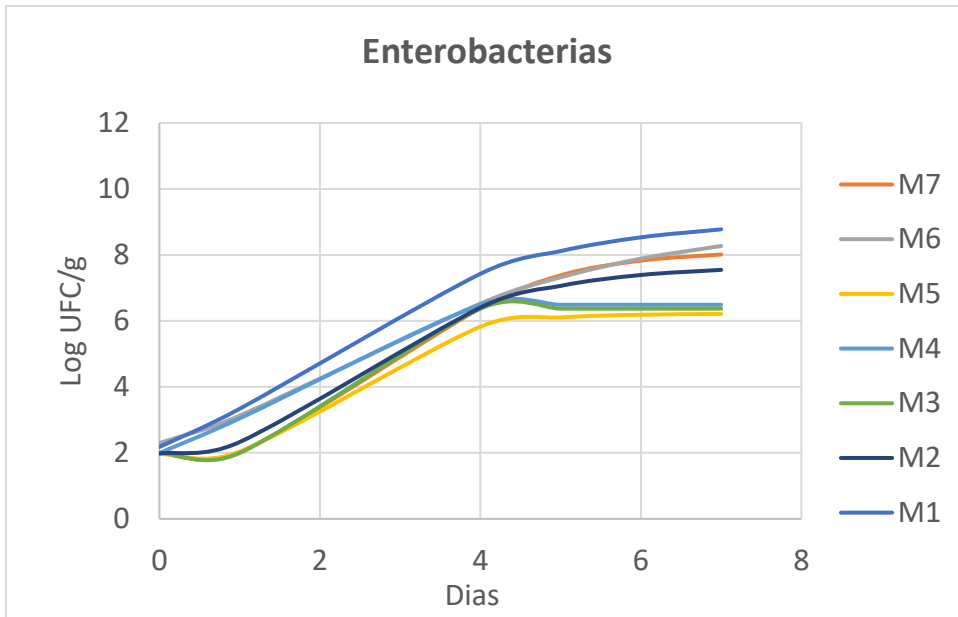


Figura 7 Recuento microbiológico de enterobacterias en recortes de pollo sin salmuera.

5.1.1.2 Análisis fisicoquímico.

El NBVT se comparó respecto a la carga microbiana del pollo para determinar un valor de NBVT que marcará el fin de la vida útil. Las piezas de pollo alcanzaron un valor máximo de NBVT a las 250 horas, lo que equivale a más de 10 días, cuando la carne había alcanzado claramente el final de su vida útil. A las 120 horas que equivale a 5 días hay una subida alta del NBVT que se traduce en un paso de 50 a 90 mg NBVT/100 mg.

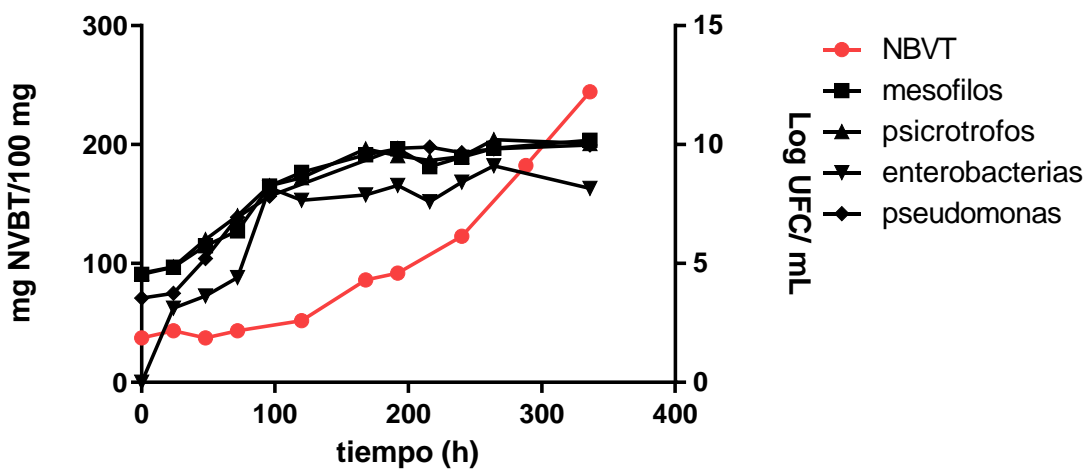


Figura 8 Comparación del NBVT respecto a la carga microbiana de los trozos de pollo sin salmuera.

5.1.1.3 Análisis sensorial.

Se llevo a cabo una comparación entre los resultados microbiológicos y la aceptabilidad del producto según los catadores. En las figuras se incluye en ordenadas el número de catadores del total (9) que rechazaron cada una de las muestras, y en abscisas los recuentos en escala logarítmica. Esta comparación se hizo para establecer un límite de microorganismos a partir de los cuales el consumidor no acepta el producto y determinar así el fin de su vida útil. Al comparar los resultados, para los grupos microbianos de psicrótrofos (Fig.9) y mesófilos (Fig.10) se obtuvo que cuando alcanzaban una carga microbiana de 8,7 Log₁₀ UFC/g los catadores rechazaban mayoritariamente el producto. En el caso de las Pseudomonas (Fig. 11) a partir de 5,9 Log₁₀ UFC/g se rechazaba el producto y para enterobacterias (Fig.12) el límite era 5,3 Log₁₀ UFC/g.

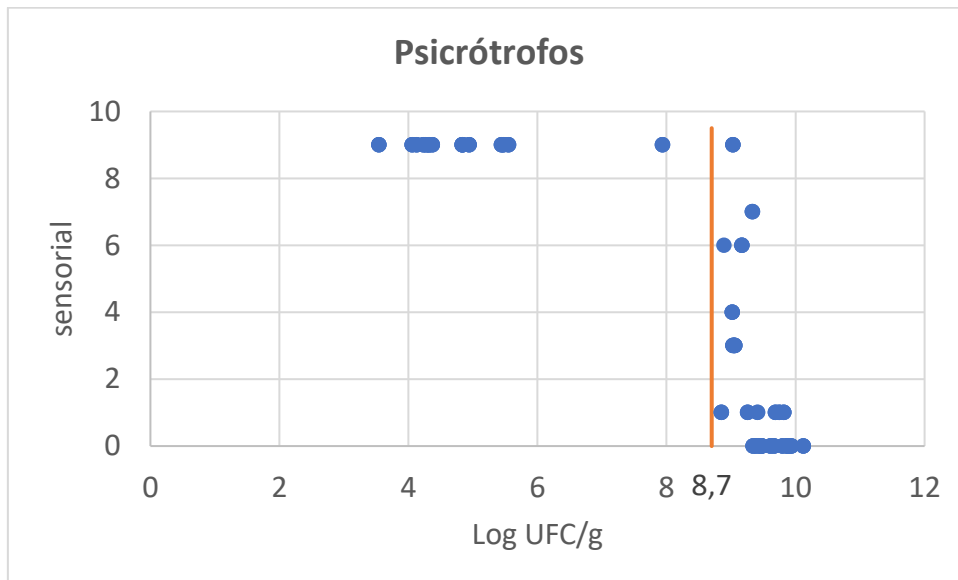


Figura 9 Gráfico comparativo entre el recuento de microorganismos psicrótrofos y la aceptabilidad del consumidor. La línea naranja marca el límite de lo que el consumidor considera aceptable.

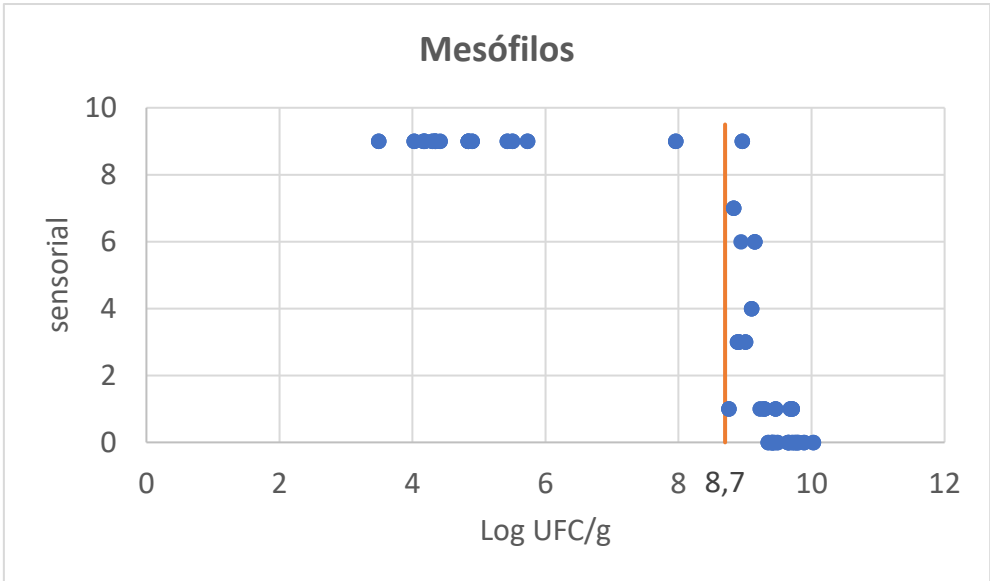


Figura 10 Gráfico comparativo entre el recuento de microorganismos mesófilos y la aceptabilidad del consumidor. La línea naranja marca el límite de lo que el consumidor considera aceptable.

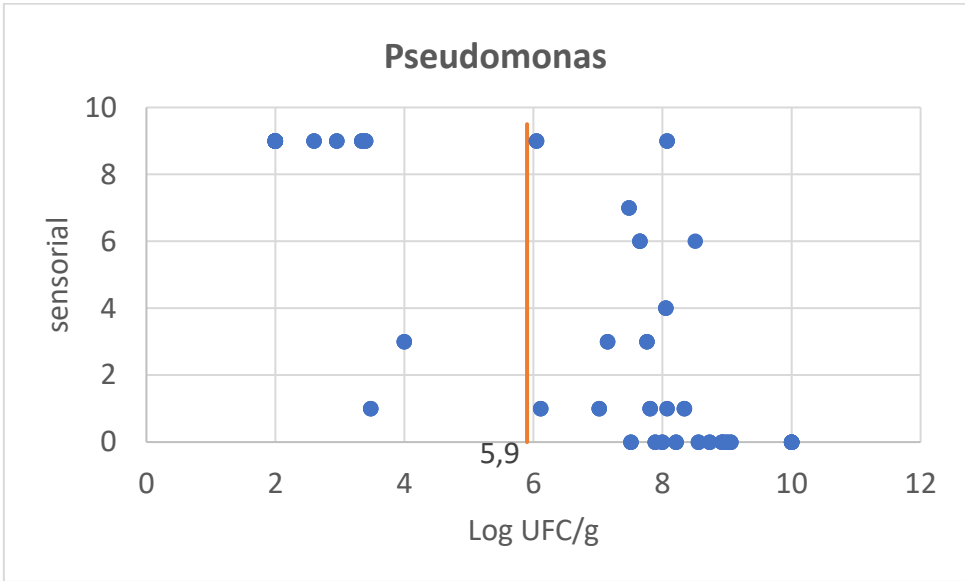


Figura 11 Gráfico comparativo entre el recuento de *Pseudomonas* y la aceptabilidad del consumidor. La línea naranja marca el límite de lo que el consumidor considera aceptable.

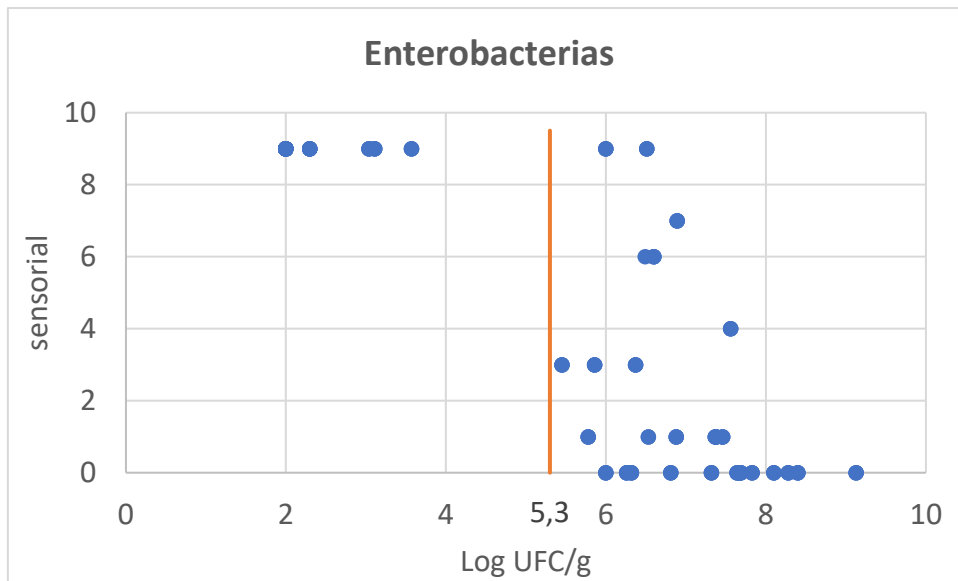


Figura 12 Gráfico comparativo entre el recuento de enterobacterias y la aceptabilidad del consumidor. La línea naranja marca el límite de lo que el consumidor considera aceptable.

5.1.2 Evolución de la alteración en distintas zonas de contramuslo de pollo.

Se llevo a cabo por duplicado seleccionando la zona inferior del hueso (A) y la zona superior del hueso (B)

5.1.2.1 Análisis microbiológicos.

Se compararon los recuentos de mesófilos (Fig. 13) entre los trozos de la zona A y B del pollo y no se encontraron diferencias significativas entre ellos, pero se observó que el crecimiento de los microorganismos era más rápido en los trozos de la zona superior del hueso. Para los psicrótrofos (Fig.14) se observó el mismo patrón.

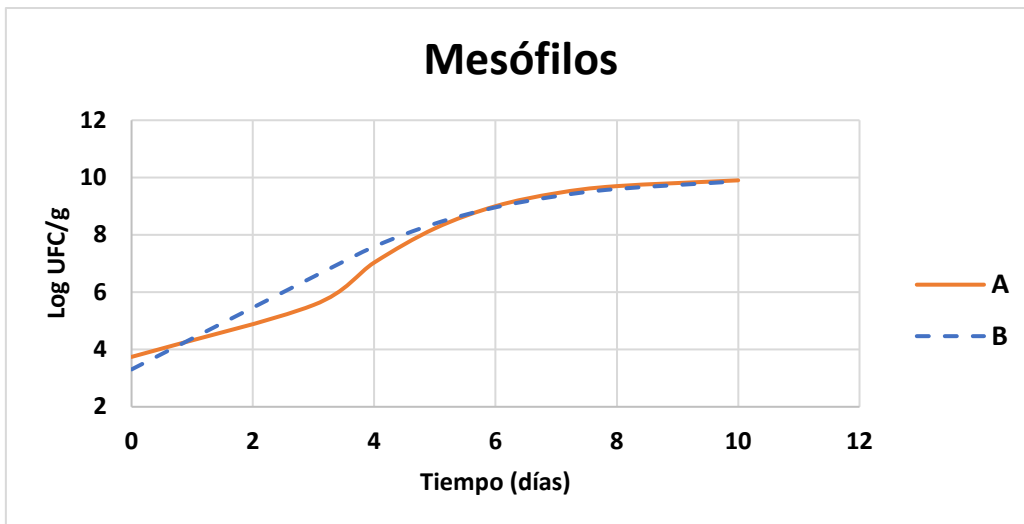


Figura 13 Gráfico comparativo entre el recuento de microorganismos mesófilos en el trozo de la zona inferior del hueso(A) y la zona superior del hueso (B).

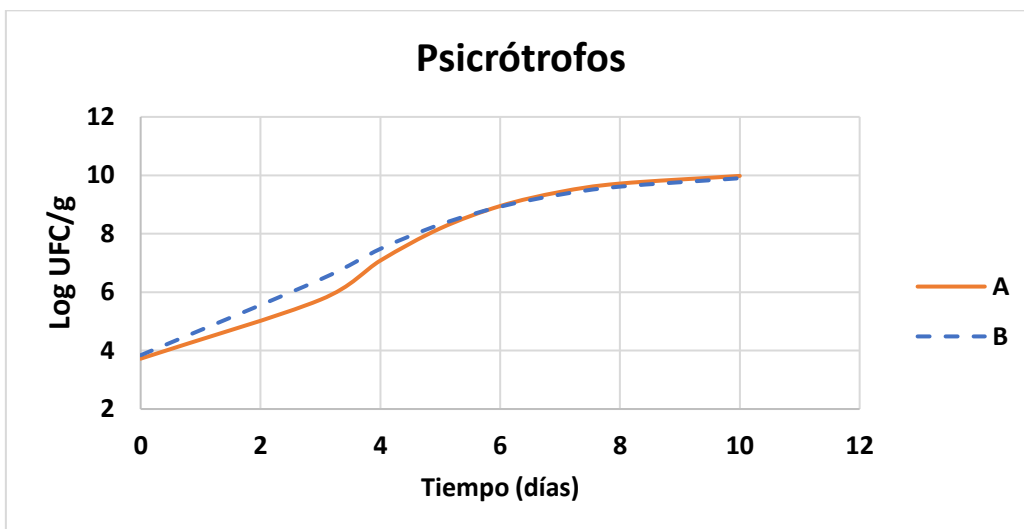


Figura 13 Gráfico comparativo entre el recuento de microorganismos psicrótrofos en el trozo de la zona inferior del hueso(A) y la zona superior del hueso (B).

5.1.2.2 Análisis fisicoquímicos.

Se comparó el NBVT y el pH de los trozos A y B y no se concentraron diferencias significativas. También se comparó el NBVT con el recuento de mesófilos (Fig.15). En el caso de los microorganismos se mantiene un crecimiento exponencial hasta los 8 días donde alcanza los 10 Log₁₀ UFC/g, en cambio el NBVT tiene un aumento prácticamente insignificante hasta el día 6 que comienza a aumentar y a partir del día 9 es cuando se dispara a valores muy altos.

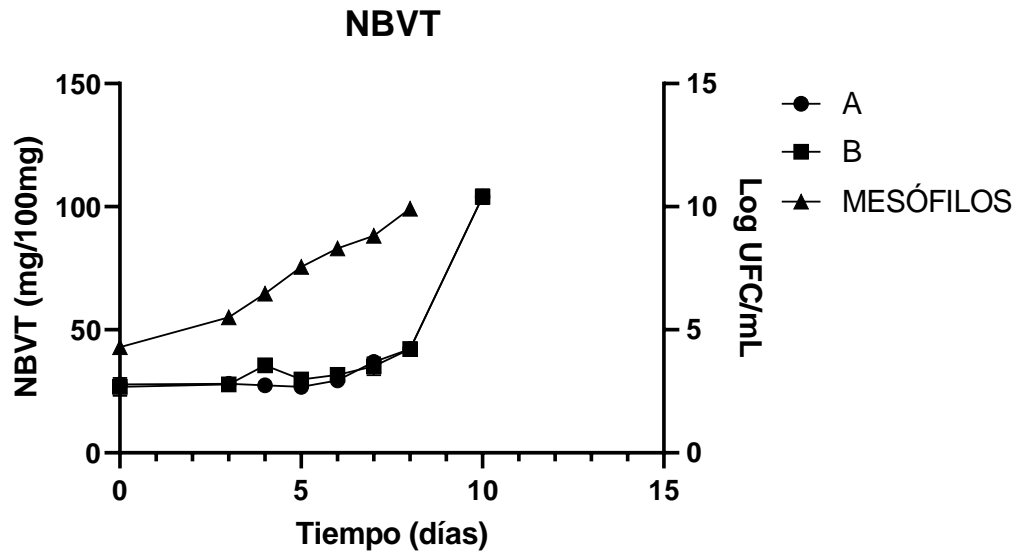


Figura 15 Evolución de los recuentos microbiológicos y el NBVT en trozos de la zona inferior del hueso(A) y la de zona superior del hueso (B) de contramuslo.

5.1.3 Evolución de la alteración de la carne de pollo antes y después de salmuerizar.

5.1.3.1 Análisis microbiológico.

En este tercer estudio se estudiaron muestras de pollo con salmuera y muestras sin salmuera (Fig.16 y 17) y se observó que aquellas muestras con salmuera mantenían su aceptabilidad durante más tiempo. Se observó que la salmuera impedía que el pollo alcanzara una carga microbiana de $10 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, ya que la carga microbiana total no superaba las $8,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ a diferencia de la muestra sin salmuerizar que sí que alcanzaba las $10 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Además, aunque la carga microbiana inicial era la misma, en torno a $4 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, los microorganismos de la muestra con salmuera crecían con mayor lentitud, lo que se tradujo en que mientras la muestra sin salmuera a los 6 días ya alcanza las $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, la muestra con salmuera tenía menos de $8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Este efecto de la salmuera se produjo tanto para recuento de microorganismos mesófilos (Fig. 16) como para el de psicrótrofos (Fig.17).

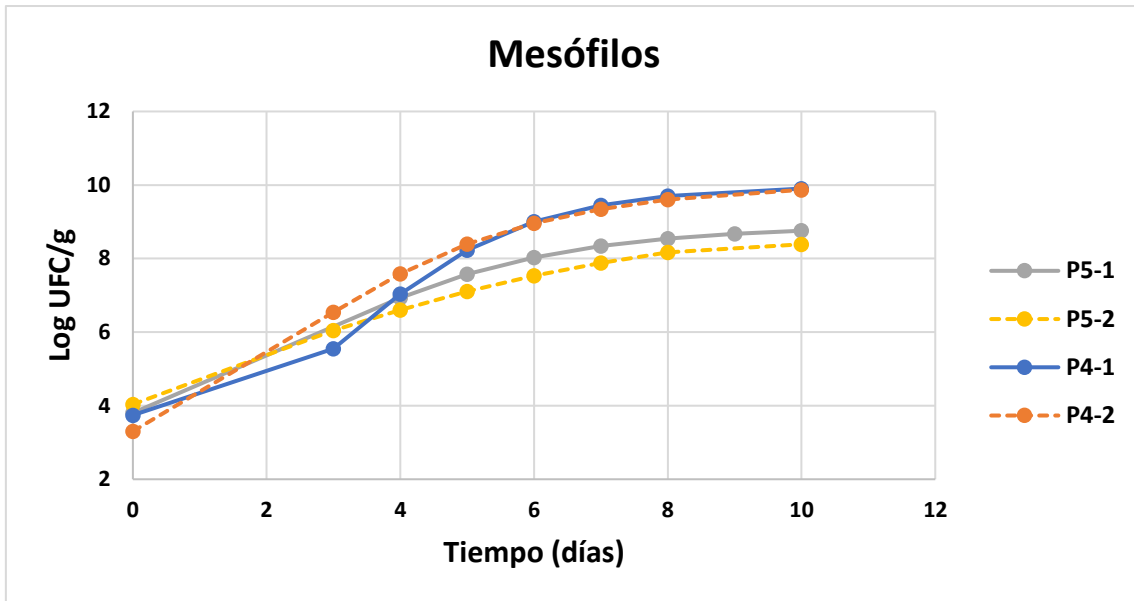


Figura 16 Gráfico comparativo de recuento de mesófilos entre piezas de pollo con salmuera (P5-2) y piezas de pollo sin salmuera (P4-1). Y sus réplicas (P5-1 y P4-2).

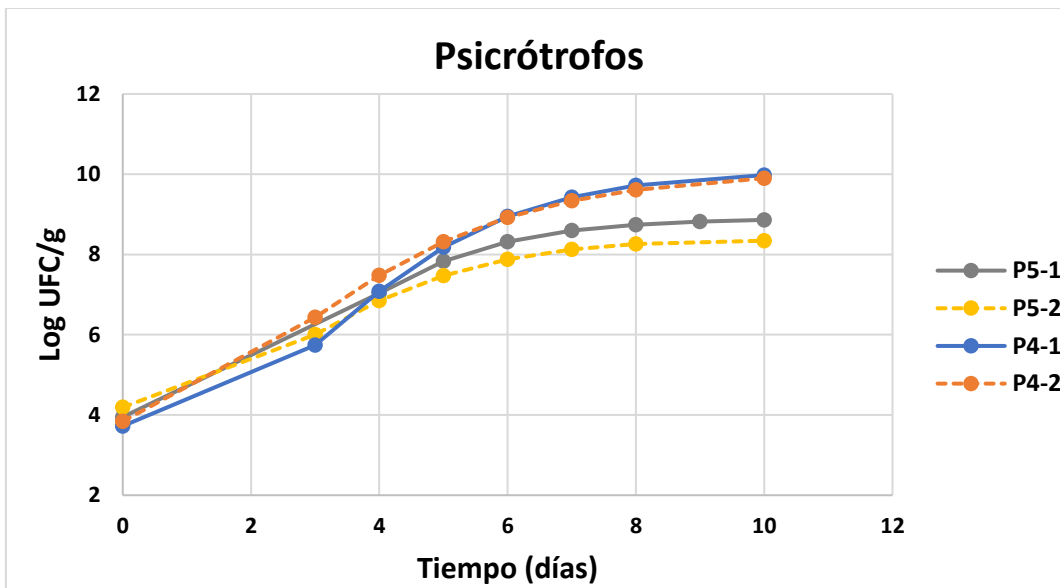


Figura 17 Gráfico comparativo de recuento de psicrótrofos entre piezas de pollo con salmuera (P5-2) y piezas de pollo sin salmuera (P4-1). Y sus réplicas (P5-1 y P4-2).

5.1.3.2 Análisis fisicoquímico.

Al analizar el NBVT (Fig. 18) se observó el mismo efecto producido por la salmuera que en los análisis microbiológicos. En este caso se observó que el NBVT tardaba más en aumentar en aquellas muestras con salmuera, mientras las muestras sin salmuera alcanzan los 35 mg de NBVT

a los 7 días, en aquellas muestras con salmuera ese mismo valor lo alcanza a los 10 días del experimento.

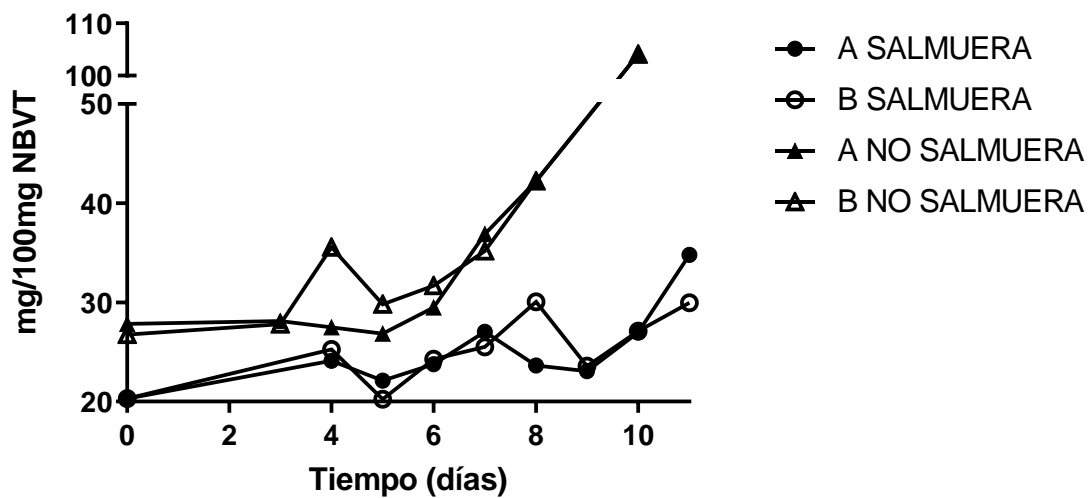


Figura 18 Gráfico comparativo de la evolución del NBVT entre piezas de pollo con salmuera (P5-2) y piezas de pollo sin salmuera (P4-1). Y sus réplicas (P5-1 y P4-2).

5.1.4 Estabilidad de la carne de pollo en distintos puntos de la cadena productiva.

5.1.4.1 Análisis microbiológico.

Se realizó el estudio de los distintos trozos de pollo de diferentes puntos del proceso de producción. Tal y como se observa en la figura 19 la muestra recogida en el P4 del proceso productivo es la que más rápido se deteriora alcanzando las 10 Log₁₀ UFC/g a los 6 días. En cambio, las del P6, P7 y P8 tienen un patrón muy similar entre ellas alcanzando las 8 Log₁₀ UFC/g a los seis días y sin alcanzar la carga microbiana máxima de 10 Log₁₀ UFC/g.

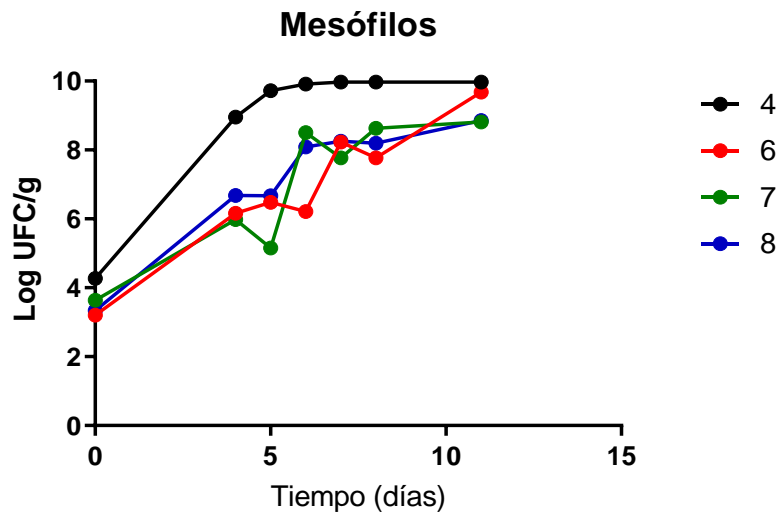


Figura 19 Gráfico comparativo del recuento de microorganismos mesófilos entre piezas de pollo de los distintos puntos del proceso productivo (P4, P6, P7 y P8).

5.1.4.2 Análisis fisicoquímico.

En este cuarto estudio se procedió a analizar el pH, la acidez y el NBVT (Fig. 20,21,22) con el fin de sacar alguna relación entre ellos para determinar el fin de la vida útil. No se encontraron diferencias significativas en la evolución del NBVT entre las muestras, salvo en la muestra P4 en la que aumentó la concentración mucho más rápidamente. En el caso del pH todas las muestras se encontraban entre 6 y 7, y su pH se modificaba disminuyendo y aumentando sin seguir ningún patrón a lo largo del experimento. A la acidez le sucedió lo mismo, la muestra P4 se comportó de forma diferente a las otras ya que comenzó con un valor de 1,8 mientras que las demás lo hicieron con un valor de 1,2. La evolución de la acidez a lo largo del estudio no siguió ningún patrón.

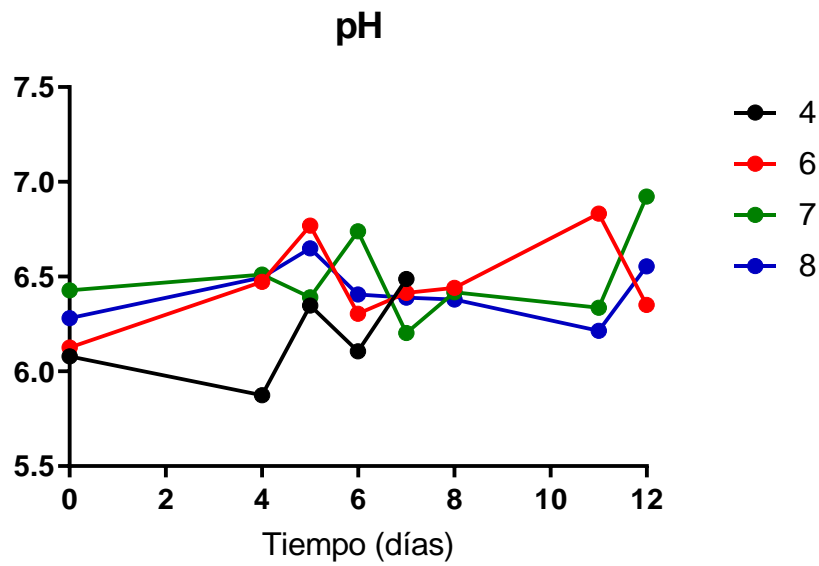


Figura 20 Gráfico comparativo de la evolución del pH entre piezas de pollo de los distintos puntos del proceso productivo (P4, P6, P7 y P8).

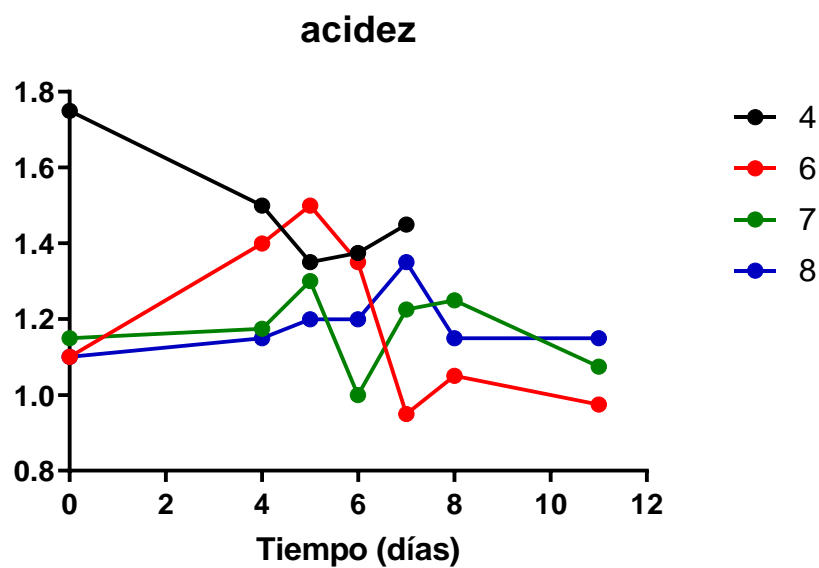


Figura 21 Gráfico comparativo de la evolución de la acidez entre piezas de pollo de los distintos puntos del proceso productivo (P4, P6, P7 y P8).

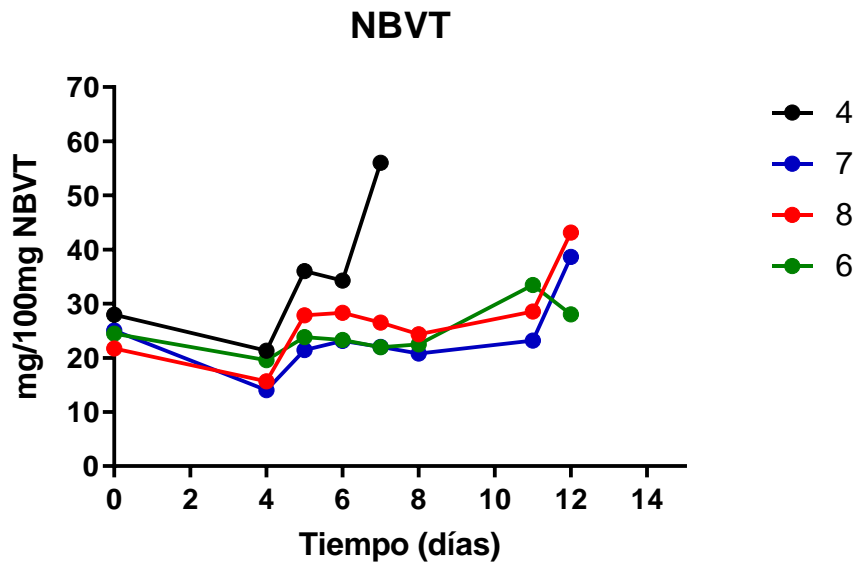


Figura 22 Gráfico comparativo de la evolución del NBVT gente piezas de pollo de los distintos puntos del proceso productivo (P4, P6, P7 y P8).

5.2. Efecto antimicrobiano de las salmueras.

El primer antimicrobiano que se probó fue el lactato (Fig. 23). Los resultados que se obtuvieron fueron: para la concentración de 30g/L no hay ningún efecto respecto al control, para la de 40g/L sí que se ve el efecto antimicrobiano ya que hasta las 96 horas no se observa crecimiento, a partir de ahí sí que hay crecimiento, pero el recuento de microorganismos es inferior al control. Y el resto de las concentraciones superiores no se observa ningún crecimiento a lo largo del experimento.

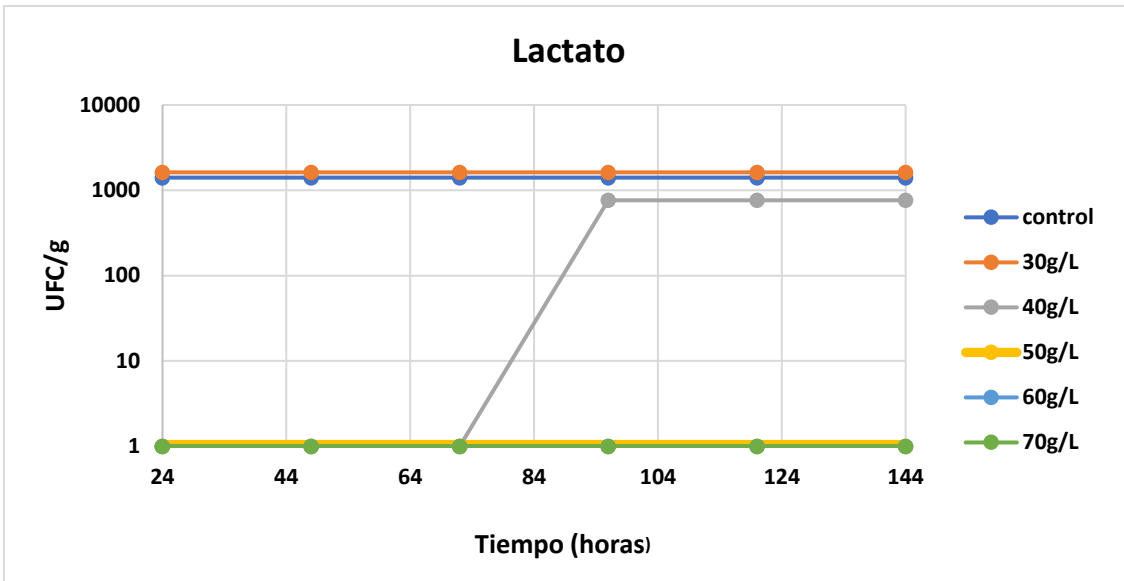


Figura 23 Efecto antimicrobiano del lactato a distintas concentraciones a lo largo de 6 días.

En el caso del Alil-isocianato (Fig. 24) solo se observó crecimiento en el control y a una concentración de 100 ppm. Para el resto de las concentraciones no hubo crecimiento en todo el experimento.

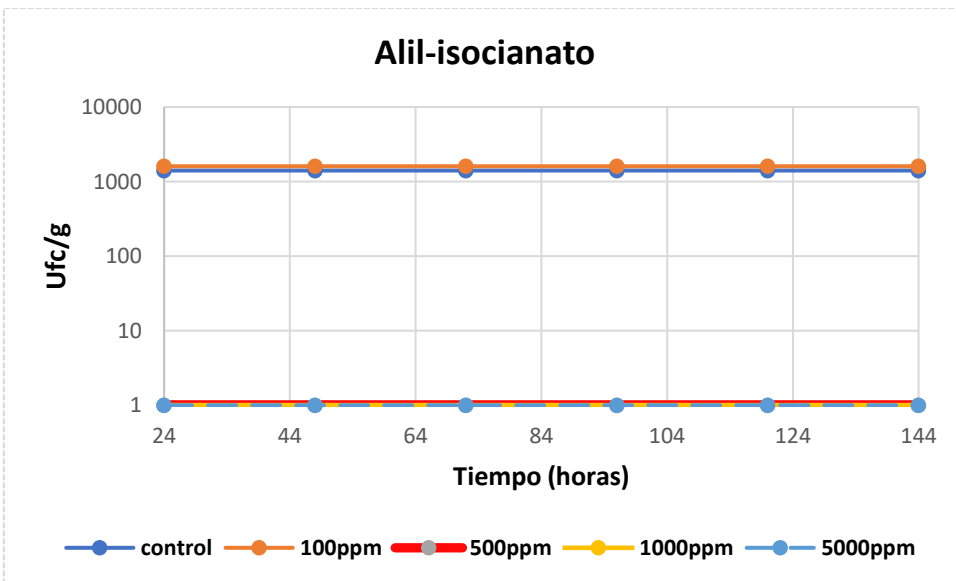


Figura 24 Efecto antimicrobiano del alil-isocianato a distintas concentraciones a lo largo de 6 días.

6. Discusión

6.1. Alteración de la carne de ave.

En el análisis microbiológico del **primer estudio** se determinó que la carga inicial microbiana del pollo era de 4 Log₁₀ UFC/g de microorganismos mesófilos y psicrótrofos. Y que para *Pseudomonas* y enterobacterias era de 2 Log₁₀ UFC/g. Además, en los posteriores estudios se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a la carga microbiana inicial.

Otro estudio (Lytou et al., 2019) establecía la carga microbiana inicial de microorganismos mesófilos en 5,5 Log₁₀ UFC/g, la de enterobacterias en 2,5 Log₁₀ UFC/g y la de *Pseudomonas* en 5,4 Log₁₀ UFC/g. Otros (Lytou, Panagou y Nychas, 2016) determinaron que la carga total de mesófilos era de 5 Log₁₀ UFC/g. Estos resultados parecen indicar que en ambos estudios trabajaron con una materia prima más contaminada respecto a las muestras utilizadas en el presente. El recuento de enterobacterias sí que resultó muy similar, al contrario que el recuento de *Pseudomonas* que resultó mucho más elevado en el estudio de Lytou. Esto parece indicar que la materia prima de origen estaba altamente contaminada con este grupo microbiano (Lytou et al., 2019).

En cuanto al análisis del NBVT se observó que aumentaba a lo largo de la vida útil. Pero ese aumento era mayor cuando el pollo ya estaba degradado, por lo que en este primer estudio no nos permitió establecer un valor límite de NBVT que pudiese ser utilizado como indicador de la alteración.

En el análisis sensorial se determinó que la vida útil del producto termina cuando el recuento de mesófilos o psicrótrofos alcanza las 8,7 Log₁₀ UFC/g lo que permitió para el resto de los estudios fijar un límite a partir del cual el producto había llegado al final de su vida útil. Además de que este valor límite también se estableció para el recuento de *Pseudomonas* en 5,9 Log₁₀ UFC/g y para enterobacterias en 5,3 Log₁₀ UFC/g, sin embargo, en ambos casos la correlación entre los recuentos y la percepción de los catadores fue mucho menor. En definitiva, el mejor indicador del límite de vida útil del producto resultó ser el recuento de mesófilos totales, o alternativamente el de psicrótrofos. En nuestra opinión el recuento de mesófilos es el más recomendable dado que los tiempos de incubación precisos para el estudio de calidad es mucho más corto.

El **segundo estudio** se realizó con muestras de contramuslo de pollo sin salmuera en busca de diferencias entre el pollo de la parte superior del hueso y la parte inferior del hueso. Se

analizaron mesófilos y psicrótrofos y en ambos casos no se observaron diferencias entre las muestras, por lo cual se puede decir que toda la pieza de pollo evoluciona de la misma forma. Además, las muestras siguieron el mismo patrón del primer estudio ya que tenían una carga inicial de $4 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Y alcanzaban a los 6 días las $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$.

Se analizó el NBVT y se comparó con el análisis microbiológico y se observó que aumentaba de forma significativa a partir del día 6 justo cuando el recuento de microorganismos alcanza las $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Por lo tanto, en este caso vuelve a suceder lo mismo que en el primer estudio y es que el NBVT aumenta una vez que el producto está claramente alterado; dicho en otras palabras, el NBVT no es un buen indicador de la alteración incipiente del producto.

En el **tercer estudio** se llevó a cabo la comparativa entre una muestra de pollo sin salmuera y una muestra de pollo con salmuera. Al determinar la vida útil de las 2 muestras se observó que el uso de la salmuera prolongaba su vida útil en 2 días, llegando hasta los 8 días, y además no llegaba a alcanzar las $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Por lo tanto, de este resultado se puede concluir que la salmuera utilizada por la empresa prolonga la vida útil y disminuye la carga total microbiana a menos de $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Otro estudio (Lyttou et al., 2019) obtuvo resultados similares a los nuestros salvo que la carga microbiana inicial en el pollo sin salmuera era menor que la cuantificada en el pollo con salmuera. Como en nuestro estudio la carga microbiana inicial es la misma para las dos muestras se deduce que la concentración o tipo de salmuera utilizada por la empresa objeto de nuestro estudio tiene un efecto bacteriostático, pero no bactericida, al contrario que la estudiada por Lyttou et al. (2019). En el caso del análisis fisicoquímico se observó el mismo efecto antimicrobiano de la salmuera ya que el aumento del NBVT también se retrasaba 2 días. Pero la subida del NBVT se producía también una vez que la vida útil llegaba a su fin; es decir, tampoco en este caso el NBVT nos aporta información adecuada para predecir el inicio de la alteración del producto salmuerizado.

En el **cuarto estudio** se analizaron las muestras que provenían de distintos puntos de la cadena de producción. En este caso se observa que la muestra del P4, que es el pollo antes de llegar a la inyectora, sigue el mismo patrón que en los demás estudios alcanzando las $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ a los 6 días. En cambio, los otros puntos 6,7 y 8 que son tras la inyección de salmuera siguen una evolución semejante y demuestra un notable efecto antimicrobiano ya que la vida útil se prolonga 2 días. Entre la muestra del P6(antes del fileteado), la del P7 (tras el fileteado) y el P8 (adición de especias superficiales y el envasado) no se observan diferencias significativas entre ellas, por lo que se deduce que el fileteado no aporta una mayor carga microbiana y que la adición de especias superficiales como el perejil no tiene efecto antimicrobiano. Sin embargo,

es posible que en ambos puntos se produzcan esos efectos pero que sean enmascarados por el efecto de la salmuera.

El análisis fisicoquímico de la evolución del NBVT confirmó los estudios anteriores y finalmente se decidió que no iba a ser útil para establecer un valor límite del fin de la vida útil en ninguno de los casos. Tampoco el pH y la acidez resultaron indicadores fiables de la alteración incipiente del producto en ninguno de los puntos de la cadena productiva.

6.2. Efecto antimicrobiano de las salmueras.

En la última parte de esta investigación, todavía en curso, realizamos el análisis del efecto antimicrobiano del lactato y el alil-isocianato. En el caso del lactato se observó que el efecto bacteriostático se manifestaba a partir de 40g/L dado que las colonias tardaban 4 días de incubación para alcanzar un tamaño macroscópico, lo que permitiría alargar la vida útil de producto consecuentemente. La concentración mínima inhibitoria resultó ser de 50 g/L, concentración que inhibió totalmente en crecimiento de microorganismo a lo largo de toda la incubación. En estudios de otros investigadores (Smaoui, Ben Hlima y Ghorbel, 2012) se utilizaron mezclas con 9g/L de lactato y un 1g/L de ácido láctico y consiguieron que al cabo de 15 días de almacenamiento a 4°C el pollo presentase un recuento de aerobios mesófilos de 6,73 Log₁₀ UFC/g, mientras que el control alcanzaba 9,42 Log₁₀ UFC/g. Estos resultados parecen indicar la existencia de un efecto sinérgico entre ambos compuestos, seguramente debido al grado de disociación del lactato.

En el caso del alil isocianato observamos que 100 ppm del compuesto no tenían ningún efecto antimicrobiano (Fig.24), pero a partir de 500 ppm se detectó una ausencia total de crecimiento. El paso inmediato de esta parte de la investigación será estudiar con detalle el efecto antimicrobiano de distintas concentraciones incluidas en este rango.

7. Conclusión

1. La materia prima de la empresa objeto de estudio es de buena calidad microbiológica, 4 Log₁₀ UFC/g de microorganismos mesófilos y psicótrofos al inicio del estudio. La de *Pseudomonas* y enterobacterias es 2 Log₁₀ UFC/g. No hay diferencias significativas entre el recuento de mesófilos y psicótrofos, por lo que es recomendable utilizar como referencia el primero con la finalidad de acortar la duración de los análisis.

2. La opinión de los catadores indica que el pollo llega al final de su vida útil cuando los recuentos de psicótrofos/mesófilos alcanzan más de 8,7 Log₁₀ UFC/g.

3. El NBVT no es un parámetro útil para establecer un valor límite de la vida útil del pollo, pero aumenta exponencialmente una vez que se acaba la vida útil de este.

6. La acidez y el pH no son buenos parámetros indicadores para analizar la evolución de la vida útil dado que cambian aleatoriamente con el tiempo.

4. El uso de la salmuera inyectada por la empresa objeto de estudio prolonga 2 días la vida útil del pollo, de seis a ocho días.

7. No hay ningún factor de riesgo en operaciones posteriores a la inyección de la salmuera, o si lo hay este queda enmascado por los efectos antimicrobianos de la salmuera.

8. El uso de lactato a la concentración de 40g/L evita el crecimiento de los microorganismos alterantes hasta el cuarto día y a partir de 50g/L no se observa crecimiento a lo largo de los 6 días periodo objeto de estudio. En el caso del alil-isocianato a partir de 500 ppm no se observa ningún crecimiento en los 6 días que duro el experimento.

8. Bibliografía

Joseph, A., Poonam Gopika, P., Roshni, M., Venkitanarayanan, K. (2020). *Spoilage bacteria and meat quality*. Department of Animal Science, University of Connecticut, Storrs, CT y United States.

Alvarado, C. y McKee, S. (2007). *Marination to Improve Functional Properties and Safety of Poultry Meat*. Journal of Applied Poultry Research, 16, pp. 113-120 DOI: 10.1093/japr/16.1.113.

AOAC (2020). *AOAC International*. Available at: <https://www.aoac.org/> [Available at: May 13, 2020].

Clelia, A. (2017). *Chapter 12 Food Spoilage and Food Safety: Is There a Link?*. The Microbiological Quality of Food. Elsevier Ltd, pp. 283-300.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). *Food Outlook-Biannual report on global food markets*. Food outlook.

Lytou, A., Renieri, C., Doulgeraki, A., Nychas, G. y Panagou, E. (2020). *Assessment of the microbiological quality and safety of marinated chicken products from Greek retail outlets*. International Journal of Food Microbiology, 320. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108506.

Lytou, A., Tzortzinis, K., Skandamis, P., Nychas, G. y Panagou, E. (2019). *Investigating the influence of organic acid marinades, storage temperature and time on the survival/inactivation interface of Salmonella on chicken breast fillets*. International Journal of Food Microbiology, 299, pp. 47-57 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.019.

Lytou, A., Panagou, E. y Nychas, G. (2016). *Development of a predictive model for the growth kinetics of aerobic microbial population on pomegranate marinated chicken breast fillets under isothermal and dynamic temperature conditions*. Food Microbiology, 55. DOI: 10.1016/j.fm.2015.11.009.

Maya, N. (2012). *Effect of decontamination and packaging treatments in modified atmospheres on the microbiological safety of chicken meat with special reference to campylobacter jejuni*. University of La Rioja.

Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2019). *El sector de la avicultura de carne en cifras*. Madrid.

Moffitt, A. (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics, 147(1). DOI: 10.1016/j.ajodo.2014.10.030.

Smaoui, S., Ben Hlima, H. y Ghorbel, R. (2012). *The effect of sodium lactate and lactic acid combinations on the microbial, sensory, and chemical attributes of marinated chicken thigh*. Poultry Science, 91(6), pp. 1473-1481. DOI: 10.3382/ps.2011-01641.

Taylor, T.M. (2015). *Using Natural Antimicrobials to Enhance the Safety and Quality of Poultry*. Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. Elsevier, pp. 1-27.

UNE-EN ISO 13720 (2011). *Carne y productos cárnicos. Recuento de Pseudomonas spp. presuntas.*

UNE-EN ISO 21528-1 (2018). *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de Enterobacteriaceae. Parte 1: Detección de Enterobacteriaceae.*

UNE-EN ISO 21528-2 (2018). *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de Enterobacteriaceae. Parte 2: Técnica para el recuento de colonias.*

UNE-EN ISO 4833-1 (2014). *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en profundidad.*

UNE-EN ISO 4833-2 (2014). *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en superficie.*

UNE-EN ISO 6887-1 (2017). *Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.*

Wang, G., Wang, H., Han, Y., Xing, T., Ye, K., Xu, X. y Zhou, G. (2017). *Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ.* Food Microbiology, 63, pp. 139-146 DOI: 10.1016/j.fm.2016.11.015.