

**Elisa Adell, Verónica Mosest, Yang Zhao, Alba Cerisuelo
y María Cambra-López**

**CONCENTRACIÓN, DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y POR TAMAÑO DE BACTERIAS
AEROBIAS MESÓFILAS EN EL AIRE DE GRANJAS DE BROILERS**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **107** N.º 2 (77-93), 2011

Concentración, distribución espacial y por tamaño de bacterias aerobias mesófilas en el aire de granjas de broilers¹

Elisa Adell*, Verónica Moset**, Yang Zhao***, Alba Cerisuelo** y María Cambra-López*

* Instituto de Ciencia y Tecnología Animal. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España

** Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA), Pol. Esperanza 100, 12400. Segorbe, Castellón, España

*** Wageningen UR Livestock Research, P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad, Países Bajos

Resumen

El material particulado (PM) y los microorganismos en el aire son dos de los principales contaminantes por vía aérea en el ámbito de la ganadería. El PM puede ir asociado a numerosos microorganismos y la inhalación de los mismos puede tener un efecto perjudicial para la salud. Los objetivos de este estudio fueron estudiar la distribución espacial de bacterias aerobias mesófilas en el aire de una granja de broilers (granja de cría de pollos para la obtención de carne), cuantificar la concentración de bacterias y de PM en el aire y su evolución a lo largo de un ciclo de producción, evaluar la relación entre el tamaño de partícula y las bacterias aerobias mesófilas, y correlacionar la evolución de las concentraciones de PM con la evolución de las concentraciones de bacterias aerobias mesófilas. Para ello se muestreó semanalmente, utilizando diferentes métodos, el aire en dos salas de una misma nave experimental de broilers durante un ciclo de 42 días. Se observó un gradiente espacial ($p < 0,001$) en la concentración de bacterias aerobias mesófilas, entre la altura de los animales y alturas mayores al comienzo del ciclo (día 3). La concentración de bacterias aerobias mesófilas en el aire varió entre 3 y 6,53 log UFC/m³. Entre el 42% y el 96% de las bacterias aerobias mesófilas se encontraron en los rangos de tamaño de partícula entre 3,3 y más de 7 μm . La concentración media de PM en el aire fue de 0,019 mg/m³ para PM_{2,5} y 0,189 mg/m³ para PM₁₀. Las concentraciones de PM y bacterias aerobias mesófilas en el aire evolucionaron de forma similar a lo largo del ciclo de producción (coeficiente de correlación entre 0,78 y 0,89), produciéndose para ambos un máximo en el día 24 del ciclo y disminuyendo a partir de entonces, coincidiendo con un incremento en la tasa de ventilación.

Palabras clave: bioaerosoles, calidad del aire, material particulado, avicultura.

Summary

Concentration, spatial and size distribution of airborne aerobic mesophilic bacteria in broiler farms

In livestock houses, particulate matter (PM) and airborne microorganism are two of the most relevant air pollutants. Particulate matter may carry microorganisms, the inhalation of which can cause detrimental health effects. The aim of this study was to study the spatial distribution of airborne aerobic mesophilic bacteria in the air of a broiler farm (rearing poultry for meat production), to quantify the concentration of airborne aerobic mesophilic bacteria and PM in the air and to study their evolution

1. Autor de correspondencia: María Cambra-López, macamlo@upvnet.upv.es

in time, as well as to evaluate the relationship between particle size and airborne aerobic mesophilic bacteria, and to correlate the evolution of PM concentrations and aerobic mesophilic bacteria concentrations. For this purpose, the air of two broiler rooms in an experimental broiler farm was sampled weekly using different methods during 42 days. There was a spatial gradient ($p < 0.001$) in aerobic mesophilic bacteria concentrations between animal height and higher heights, at the beginning of the production cycle (day 3). The concentration of aerobic mesophilic bacteria in the air ranged from 3 to 6.53 log CFU/m³. Between 42% and 96% of aerobic mesophilic bacteria in the air were found in the particle size ranges between 3.3 to more than 7 μm . The PM concentration in the air was equal to 0.019 mg/m³ for PM_{2.5} and equal to 0.189 mg/m³ for PM₁₀. The PM and bacteria concentrations followed a similar evolution during the production cycle (correlation coefficient between 0.78 and 0.89), showing a maximum concentration on day 24 and decreasing thereafter, coinciding with an increase in the ventilation rate.

Key words: bioaerosols, particulate matter, air quality, poultry.

Introducción

El material particulado (del inglés, Particulate Matter; PM) suspendido en el aire en alojamientos ganaderos se compone principalmente de partículas fecales, pienso, partículas de piel, pelo, plumas y polvo mineral en diferentes proporciones (Cambra-López *et al.*, 2011a y b). Estas partículas pueden ir solas o asociadas a numerosos microorganismos, en ocasiones patógenos, pudiendo facilitar su transmisión entre animales y humanos dentro de las explotaciones y ocasionando problemas sanitarios (Chinivasagam *et al.*, 2009). Se denomina bioaerosol al conjunto de partículas en suspensión con un diámetro que varía entre 0,5 y 100 μm , de origen o actividad biológica que pueden afectar a seres humanos causándoles algún tipo de patología (Cox y Wathes, 1995). En este sentido, el PM y los bioaerosoles son dos de los principales contaminantes aéreos en el ámbito de la ganadería (Seedorf *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 1998).

De entre las partículas biológicas que pueden ir asociadas a los bioaerosoles se encuentran esporas, hongos, virus, bacterias, toxinas y alérgenos. La principal fuente generadora de bioaerosoles en alojamientos ganaderos son los propios animales a través

de sus secreciones y excreciones; además del pienso y la cama, en aquellas explotaciones en las que esté presente (Cox y Wathes, 1995). La concentración de bioaerosoles en el aire varía con el sistema de alojamiento, el animal y los factores ambientales.

La inhalación de bioaerosoles puede afectar a seres humanos causándoles algún tipo de patología, ya sea de tipo alérgico, tóxico, infeccioso u otros (Cox y Wathes, 1995). Los problemas de salud más frecuentemente asociados a la exposición a bioaerosoles son los problemas respiratorios y las enfermedades infecciosas (Douwes *et al.*, 2003). Además, la exposición aguda y crónica de los animales a los bioaerosoles puede ocasionar una disminución en el rendimiento productivo (Donham, 1991).

La frecuencia y gravedad de los posibles problemas respiratorios y enfermedades infecciosas ocasionados por los bioaerosoles depende del tipo, tamaño, cantidad y supervivencia de los microorganismos. Además, se ha demostrado que el PM puede actuar como sustrato para los microorganismos ya que proporciona un ambiente adecuado para su supervivencia (Millner, 2009). Las partículas pueden proteger a los microorganismos de condiciones climáticas adversas como por ejemplo de la temperatura, la

humedad relativa y la radiación ultravioleta (Cox y Wathes, 1995), que pueden provocar su inactivación. La forma y el tamaño del PM también determinan el periodo de supervivencia de los microorganismos en el aire. El tamaño de partícula determina el tiempo que la partícula permanecerá suspendida en el aire (Cox y Wathes, 1995) de manera que, a menor tamaño permanecerá más tiempo suspendida.

En general, entre los diferentes alojamientos ganaderos, las granjas de broilers (granja de cría de pollos para la obtención de carne) son las que mayores concentraciones de PM y bioaerosoles presentan (Takai et al., 1998). Estas diferencias se deben a las particularidades de este tipo de animales y del alojamiento: a la presencia de plumas jóvenes en broilers (plumón) que fácilmente pueden ser aerotransportadas, a la excreción de ácido úrico encapsulado en forma de partículas esféricas, así como al tipo de alojamiento (sobre suelo) con material de cama (Cambra-López et al., 2011a). Los microorganismos más comúnmente aislados en los alojamientos ganaderos son las bacterias Gram positivas, siendo las bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* las que predominan (Matkovic et al., 2007). Entre las bacterias Gram negativas, las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son las más abundantes (Zucker et al., 2000). Sin embargo, todavía se desconoce cuál es el comportamiento de las bacterias suspendidas en el aire de granjas, su distribución y cómo se relacionan con el PM. Esta información podría ser útil para predecir sus niveles, evaluar los posibles riesgos para la salud y así contribuir a desarrollar medidas para reducir sus efectos perjudiciales en granjas de broilers.

En este contexto, los objetivos de este trabajo son:

1. Estudiar la distribución espacial de bacterias aerobias mesófilas en el aire durante un ciclo de producción de broilers.
2. Cuantificar la concentración de bacterias aerobias mesófilas y de PM en el aire de granjas de broilers y estudiar su evolución a lo largo de un ciclo de producción.
3. Evaluar la relación entre el tamaño de partícula y las bacterias aerobias mesófilas en el aire de granjas de broilers.
4. Identificar la correlación entre la evolución de las concentraciones de PM y las concentraciones de bacterias aerobias mesófilas en el aire de granjas de broilers.

Material y métodos

Instalaciones y animales

La experiencia se llevó a cabo en dos salas piloto (sala 1 y sala 2) de la nave experimental de cebo aviar del Centro de Investigación y Tecnología Animal perteneciente al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), situado en Segorbe (Castellón). Cada sala tenía unas dimensiones de 13 x 6 metros. Las salas disponían de un mecanismo de ventilación forzada controlado mediante un sistema copilot (Copilot System®, Barcelona), con dos ventiladores situados en el techo de cada sala. El sistema de refrigeración empleado fue de refrigeración evaporativa, a partir de unos paneles humidificadores por los que se hace pasar el aire procedente del exterior a través de una película de agua que lo enfría.

Para la experiencia se utilizaron un total de 576 pollos macho (línea Hubbard) de un día de vida y 42 ± 3 g de peso. Al comienzo del ciclo, los pollos se dividieron de forma aleatoria en ambas salas. Se utilizó viruta de madera como cama (de 10 cm de espesor). El ciclo de crecimiento se desarrolló en verano, y duró 42 días durante los cuales los animales fueron alimentados con piensos comerciales.

Parámetros productivos

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

Parámetros ambientales

Se registró la temperatura y la humedad relativa de forma continua durante todo el ciclo cada 5 minutos en 2 puntos diferentes en el interior de cada sala. Para ello se utilizaron sensores de temperatura y humedad relativa (HOBO H8-007-02, Onset Computer Crp, Pocasset, Mass, EEUU; HOBO U12-O13 Onset Computer Crp, Pocasset, Mass, EEUU). Además el caudal de ventilación se calculó en cada sala a partir de un balance de dióxido de carbono (CO₂) utilizando sondas con sensores de CO₂ (Vaisala GMT-222, 0-1000 ppm) y un datalogger (HOBO U12-O13 Onset Computer Crp, Pocasset, Mass, EEUU) para la recogida de datos en continuo. La emisión de CO₂ de los animales se estimó según valores obtenidos por Calvet *et al.* (2010). El día 29 del ciclo se incrementó la tasa de ventilación y se puso en marcha el sistema de refrigeración evaporativa en cada sala.

Muestreo de bacterias aerobias mesófilas en el aire

Para cumplir con los objetivos de este estudio, se utilizaron tres sistemas de muestreo de bacterias en el aire: el sistema de sedimentación en placa (método pasivo); el sistema de borboteadores de aire o "impingement" y el sistema de impactación en cascada (los dos últimos, métodos inerciales).

La diferencia entre estos sistemas de muestreo radica en el método de captación de la muestra (sin aire forzado para el método pasivo y con aire forzado para los métodos inerciales), además del diámetro de corte y por lo tanto, el tamaño de partícula muestreado. Mediante la sedimentación en placa se obtuvieron, principalmente, bioaerosoles adheridos a tamaños de partícula grande o conglomerados de partículas que se depositaban sobre la placa con agar por gravedad. Los borboteadores captaron, en un medio líquido mediante aspiración del aire, partículas superiores a 0,3 µm de diámetro. El impactador en cascada recogía la muestra directamente en agar mediante aspiración del aire y separaba por tamaños de partículas; permitiendo posteriormente, evaluar la relación entre el tamaño de partícula y los microorganismos en el aire.

Así, el sistema de sedimentación en placa permitió estudiar la distribución espacial de las bacterias aerobias mesófilas cultivables en las salas, el sistema de borboteador de aire permitió cuantificar la evolución de las concentraciones de estas bacterias en el aire a lo largo del ciclo de producción, mientras que el sistema de impactación en cascada permitió relacionar las bacterias aerobias mesófilas cultivables en el aire con el tamaño de partícula. El aire se muestreó semanalmente los días 3, 17, 24, 31 y 38 del ciclo.

Distribución espacial de las bacterias aerobias mesófilas cultivables medida mediante sedimentación en placa

Para estudiar la distribución en el aire de bacterias aerobias mesófilas se utilizó la técnica de sedimentación en placa. Para ello se colocaron en cada sala un total de 36 placas con un medio de cultivo para bacterias aerobias mesófilas (PCA, del inglés Plate Count Agar) (Liofolchem, TE, Italia), en tres alturas (12 placas por altura y sala): de 10 a 30 cm del suelo (altura de respiración de los

animales, que varió debido al crecimiento de los animales), a 150 cm del suelo (altura de respiración de personas) y a 200 cm del suelo (altura de la salida de la ventilación).

Semanalmente, las placas con PCA se colocaron abiertas durante tiempos variables para obtener un número de colonias entre 30 y 300 para su recuento. Este tiempo varió entre 5 y 30 minutos según la semana del ciclo de engorde de los pollos. Tras la exposición, las placas se incubaron en estufa a 30°C durante 48 horas. Tras la incubación, las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contadas. Este muestreo se realizó únicamente durante las primeras 3 semanas del ciclo de producción ya que a partir del día 17, el elevado número de microorganismos en el aire imposibilitó la lectura de las placas.

Concentración y evolución de las bacterias aerobias mesófilas cultivables medidas mediante el sistema de borboteadores

Para el recuento de bacterias aerobias mesófilas en el aire, éste se muestreó en un medio líquido utilizando un sistema de frascos borboteadores "impingers" (AGI-30, Ace Glass, Inc., Vineland, NJ, EEUU). Éstos funcionaban recogiendo un volumen de aire conocido en un medio de captación líquido. El medio de captación utilizado estaba compuesto por 20 mL de agua de peptona tamponada estéril, 0,01% de Tween y 0,005% de antiespumante. El muestreo se hizo por triplicado en cada sala (3 impingers/sala). El caudal de aire muestreado fue 12,5 L/min por cada impinger, que se obtenía mediante una bomba de succión de caudal constante calibrada (75 Mb, Ilmivac, Ilmenau, Alemania). El diámetro de corte de los borboteadores de aire fue de 0,3 µm. Todos los microorganismos por encima de este diámetro fueron recogidos.

El muestreo se llevó a cabo en el centro de cada sala en un punto próximo a la salida del aire, a 1,5 m de altura. Las muestras de

aire se recogieron semanalmente en cada sala durante un tiempo de 15 minutos. Las muestras recogidas se mantuvieron refrigeradas (4°C) durante su transporte hasta el laboratorio.

La muestra se procesó en el laboratorio antes de 2 horas. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra y la solución líquida se sembró en placa con medio de cultivo PCA. Las placas se incubaron en estufa a 30°C durante 48 horas.

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

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

Siendo:

UFC: Unidades formadoras de colonias contadas en la placa

V. muestra: Volumen de la muestra (20 mL)

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

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

t: Tiempo de muestreo (15 min)

Distribución según el tamaño de partícula de las bacterias aerobias mesófilas cultivables en el aire mediante impactación en cascada

Para muestrear bacterias aerobias mesófilas en el aire en función del tamaño de partícula al que podrían estar adheridas, se utilizó un impactador en cascada en agar (Six Stage Viable, Andersen Cascade Impactor, Thermo Scientific, EEUU). Este impactador separaba las partículas de acuerdo a su diámetro aerodinámico, desde un mínimo de

0,65 μm hasta un máximo de 7 μm , haciendo pasar la muestra por diferentes tamaños de poro (Tabla 1). El caudal de aire muestreado fue 28,1 L/min que se obtenía mediante una bomba de succión de caudal constante calibrada.

Este impactador constaba de seis plataformas consecutivas perforadas con tamaños de poro decrecientes. Sobre cada una de las plataformas se colocó una placa de vidrio (DURAN Group GmbH, Alemania) con 27 mL de medio de cultivo PCA.

Tabla 1. Rango de tamaños de partículas del impactador en cascada
Table 1. Particle size ranges for the cascade impactor

	Rango de tamaño de partículas (μm)
Nivel 1	0,65 – 1,1
Nivel 2	1,1 – 2,1
Nivel 3	2,1 – 3,3
Nivel 4	3,3 – 4,7
Nivel 5	4,7 – 7,0
Nivel 6	≥ 7

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

Entre muestreos, el impactador se desinfectó con una solución de etanol al 70%. Las placas de agar se transportaron en refrigeración (4°C) al laboratorio antes de haber transcurrido 2 horas desde el muestreo.

Después del muestreo, estas placas se incubaron en estufa a 30°C durante 48 horas. Tras la incubación, las unidades formadoras de colonias fueron contadas. El número de unidades formadoras de colonias en el aire ambiente se calculó en relación al flujo de aire y el tiempo de muestreo para obtener las unidades formadoras de colonia por metro cúbico de aire muestreado, según la siguiente ecuación:

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

Siendo:

UFC: Unidades formadoras de colonias contadas en la placa

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

t: Tiempo de muestreo (min)

A partir del día 31 del ciclo, debido al elevado número de microorganismos en el aire en la explotación, las placas fueron lavadas para diluir la concentración de colonias según la metodología propuesta por Zhao et al. (2011a y b). El lavado se realizó añadiendo 2 mL de agua de peptona estéril a cada una de las placas y mediante un asa de siembra se rascó la superficie del agar, sin dañarlo. Los 2 mL de agua de peptona se vertieron en un frasco estéril. Esta operación se repitió tres veces, obteniendo un total de 6 mL por placa. A partir de esta solución, se realizó el recuento en placa.

Para estas placas, el número de unidades formadoras de colonia en el aire ambiente se calculó en relación al flujo de aire, el tiempo de muestreo y el volumen de agua de peptona añadida, para obtener las unidades formadoras de colonia por metro cúbico de aire muestreado.

Concentración y evolución de material particulado en el aire

Semanalmente, se registraron en continuo las concentraciones de dos fracciones de partículas en el aire en cada sala: PM10 (material particulado de 10 μm de diámetro o inferior) y PM2,5 (material particulado de 2,5 μm de diámetro o inferior) con el sistema "Tapered element oscillating microbalance", TEOM (TEOM®, modelo 1405-D Thermo Fisher Scientific, EEUU). De esta forma fue posible relacionar la evolución del PM a lo largo del ciclo, con la evolución de las bacterias aerobias mesófilas. El TEOM medía la masa de PM mediante determinación de la frecuencia propia de vibración de un dispositivo de vidrio de forma tubular anclado en uno de sus extremos.

Las muestras de PM se tomaron a 2 m de altura. El muestreo fue semanal en ambas salas. El tiempo de muestreo fue de 24 horas por sala y semana. El equipo se programó para registrar concentraciones cada minuto.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a partir de la sedimentación en placa se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SAS System Software (Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, EEUU) para determinar la variación en el número de colonias por altura en cada sala. Los valores medios de recuento por alturas, salas y semanas fueron comparados mediante el test de compara-

ción de medias tukey para un nivel de significación estadística del 5%.

Los resultados obtenidos semanalmente mediante cada uno de los métodos de muestreo se presentan como medias por sala y semana.

Para identificar la correlación entre la evolución de las concentraciones de PM y las concentraciones de bacterias aerobias mesófilas en el aire, se calculó el coeficiente de correlación entre la concentración de PM2,5 y PM10 y la de bacterias aerobias mesófilas, utilizando los recuentos de bacterias aerobias mesófilas medidos con los borboteadores y utilizando el paquete estadístico SAS System Software (Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, EEUU).

Resultados y discusión

Parámetros productivos

Los parámetros productivos de los animales se encontraron dentro de los rangos habituales en broilers. Los valores medios de CMD, GMD e IC durante todo el ciclo se presentan en la Tabla 2 para cada sala.

Parámetros ambientales

La Tabla 3 resume la temperatura y la humedad relativa media para todo el ciclo de producción. Éstas fueron similares a lo largo del ciclo en ambas salas y se encontraron dentro de los rangos normales para el adecuado crecimiento de los animales.

En la Figura 1 se presenta la evolución de la tasa de ventilación a lo largo del ciclo para cada sala. La ventilación fue similar durante la primera mitad del ciclo en ambas salas, sin embargo, la tasa de ventilación de la sala 1 fue superior a la de la sala 2 en la segunda mitad del ciclo, debido al control de la

Tabla 2. Valores medios de ganancia media diaria (GMD), consumo medio diario (CMD), e índice de conversión (IC) durante todo el ciclo de producción de broilers en cada sala
 Table 2. Average weight gain (GMD), feed intake (CMD), and feed conversion (IC) in each room during the broiler production cycle

	GMD (g/día)	CMD (g/día)	IC (kg pienso/kg peso)
Sala 1	63,2	103,7	1,64
Sala 2	67,6	110,5	1,63

Tabla 3. Media de temperatura (T^a), humedad relativa (HR) y desviación estándar (Desvest) a lo largo del ciclo de producción de broilers en cada sala
 Table 3. Average temperature (T^a), relative humidity (HR) and standard deviation (Desvest) in each room during the broiler production cycle

	T ^a (°C)	Desvest T ^a	HR (%)	Desvest HR
Sala 1	28,0	2,1	44,8	15,6
Sala 2	27,6	1,5	46,5	13,4

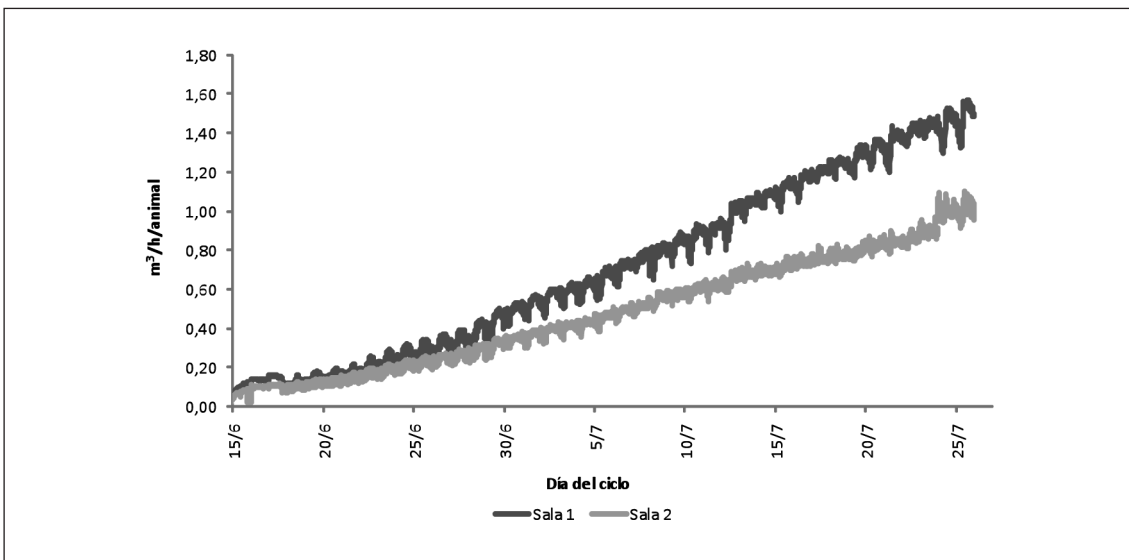


Figura 1. Tasa de ventilación (m³/h/animal) durante el ciclo de producción de broilers en cada sala.
 Figure 1. Ventilation flow rate (m³/h/animal) in each room during the broiler production cycle.

climatización. No obstante, la tasa de ventilación media en la sala 1 para todo el ciclo ($0,7 \pm 0,5 \text{ m}^3/\text{h}/\text{animal}$) fue comparable con la tasa de ventilación media en la sala 2 ($0,5 \pm 0,3 \text{ m}^3/\text{h}/\text{animal}$).

Distribución espacial de las bacterias aerobias mesófilas en el aire

En la Tabla 4 se presenta el recuento medio de los 12 puntos en cada una de las alturas muestreadas mediante la técnica de sedimentación pasiva, por día de muestreo y sala. En general, se observó que la concentración bacteriana aumentó del día 3 al día 17 de ciclo en ambas salas.

En cuanto a la distribución de las bacterias, en el muestreo realizado el día 3 del ciclo se

observó un gradiente significativo de bacterias entre las tres alturas ($p < 0,001$), encontrándose un mayor número de bacterias aerobias mesófilas a la altura de los animales (30 cm) en ambas salas, tal y como describieron Saleh et al. (2005). Esto es debido a que los animales y sus deyecciones son la principal fuente de microorganismos al aire (Seedorf et al., 1998). Sin embargo, dos semanas después (día 17 del ciclo), se observó un incremento en el número de bacterias respecto al muestreo anterior, aunque no se observaron diferencias significativas en el recuento de bacterias aerobias mesófilas entre las tres alturas. Estos resultados indican una distribución más homogénea de las bacterias aerobias mesófilas en el aire a partir de este momento, probablemente debido a una mayor concentración de bacterias aero-

Tabla 4. Media del logaritmo de unidades formadoras de colonia (log UFC), error estándar de la media (EEM) y p-valor del recuento de bacterias aerobias mesófilas a diferentes alturas por día de del ciclo, sala y altura

Table 4. Average logarithm of colony forming units (log UFC), standard error of the mean (EEM) and p-value of the aerobic mesophilic bacteria counts at different heights per day in the cycle, room and height

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

bias mesófilas y a un incremento de la ventilación que favoreció la homogeneización del aire en las salas.

Concentración y evolución de las bacterias aerobias mesófilas en el aire

La Figura 2 muestra el recuento de bacterias aerobias mesófilas obtenido utilizando la técnica de borboteadores de aire a lo largo del ciclo para cada sala. El promedio de concentración de UFC en el aire teniendo en cuenta las dos salas fue $6,28 \pm 1,14$ log UFC/m³, muy similar al recuento obtenido en otros estudios. Por ejemplo, Seedorf et al. (1998) obtuvieron un recuento de 6,43 log UFC/m³, y Bakutis et al. (2004), obtuvieron 6,67 log UFC/m³ en broilers.

En ambas salas, la evolución en el tiempo de la concentración de bacterias aerobias mesófilas fue similar. Se mostró un incremento semanal en el número de UFC desde el comienzo de la experiencia hasta alcanzar el máximo de concentración el día 24 del ciclo, en el que se obtuvo el recuento de 6,53 log UFC/m³ en la sala 1 y de 6,41 log UFC/m³ en la sala 2 (ambos equivalen a 10⁶ UFC/m³). A partir de entonces, los recuentos disminuyeron aunque los valores se mantuvieron elevados respecto a los valores iniciales, entre 5,7 y 6 log UFC/m³.

En la bibliografía se describe que el recuento de bacterias en el aire incrementa con la edad de los pollos (Saleh et al., 2005; Oppliger, 2008), mostrando su concentración máxima alrededor de la cuarta semana del ci-

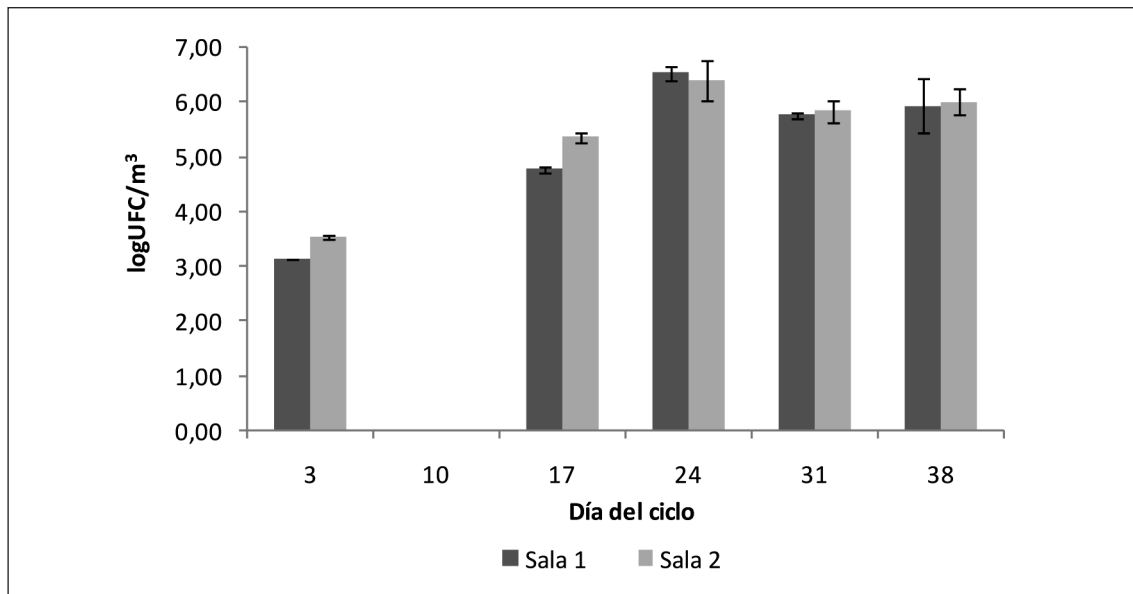


Figura 2. Recuento de bacterias aerobias mesófilas de la muestra obtenida mediante los borboteadores de aire a lo largo del ciclo de producción de broilers en cada sala.

Figure 2. Aerobic mesophilic bacteria concentrations in each room during the broiler production cycle, using impingers.

clo (Cox y Wathes, 1995), tal y como sucede en nuestro estudio. Después, puede descender ligeramente debido al aumento en la tasa de ventilación, considerando los valores elevados de ventilación que normalmente se alcanzan a finales del ciclo de producción de broilers.

Relación entre el tamaño de partícula y las bacterias aerobias mesófilas

En la Tabla 5 se observa el recuento de bacterias aerobias mesófilas a lo largo del ciclo, recogidas mediante la técnica de impactación en cascada. Se presenta para cada sala el logaritmo de UFC medio obtenido en cada uno de los 6 niveles del equipo de muestreo, correspondientes a los distintos tamaños de partículas. Esta tabla muestra un incremento semanal de bacterias durante el

ciclo para todos los tamaños de partícula en ambas salas. El promedio del logaritmo de la concentración de UFC en el aire teniendo en cuenta las dos salas fue $7,11 \pm 1,60 \log \text{ UFC/m}^3$, siendo ligeramente superior en la sala 2.

La Figura 3 y la Figura 4 muestran los resultados de la Tabla 5 expresados en porcentaje de bacterias para cada uno de los 6 niveles del equipo de muestreo y en cada sala, a lo largo del ciclo de producción. Se observa que el recuento máximo de bacterias aerobias mesófilas en general se encontró en los rangos de partículas gruesas. La Figura 3 muestra que entre el 42% y el 96% de las bacterias aerobias mesófilas se encontraron en los rangos de tamaño de partícula entre 4,7 y 7 μm en la sala 1. La Figura 4 muestra que entre el 57% y el 83% de las bacterias aerobias mesófilas se encontraron en los

Tabla 5. Recuento de bacterias aerobias mesófilas ($\log \text{ UFC/m}^3$) obtenidos mediante impactación en cascada según rango de tamaño de partículas a lo largo del ciclo de producción de broilers en cada sala

Table 5. Aerobic mesophilic bacteria counts ($\log \text{ UFC/m}^3$) according to particle size range in each room, during the broiler production cycle using the cascade impactor

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

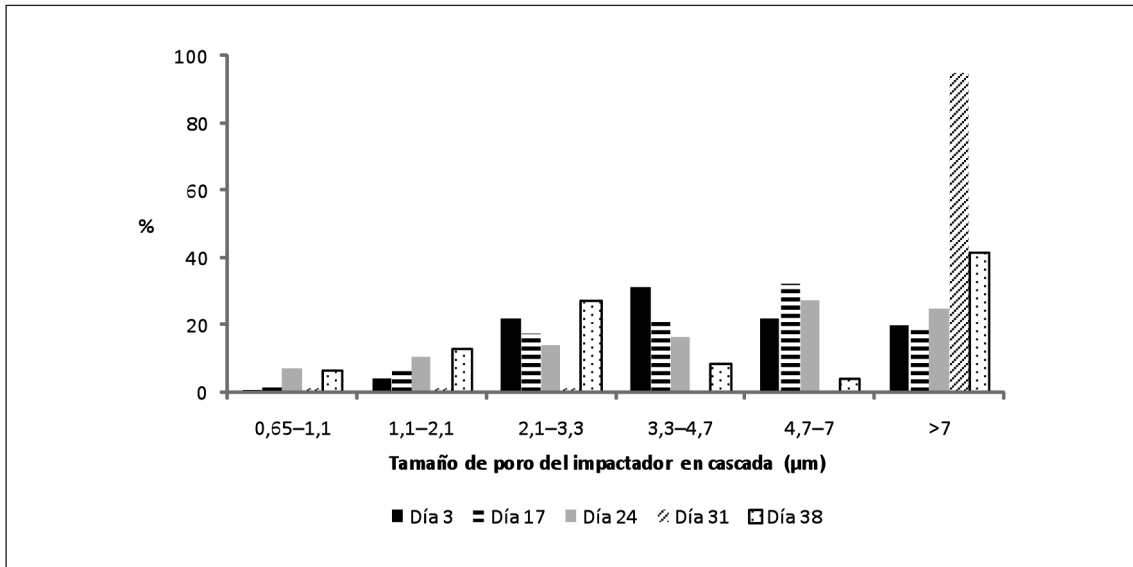


Figura 3. Porcentaje de microorganismos según el tamaño de poro del impactador en cascada durante el ciclo de producción de broilers en la sala 1.
 Figure 3. Percentage of microorganism depending on particle size collecting with cascade impactor during the broiler production cycle in room 1.

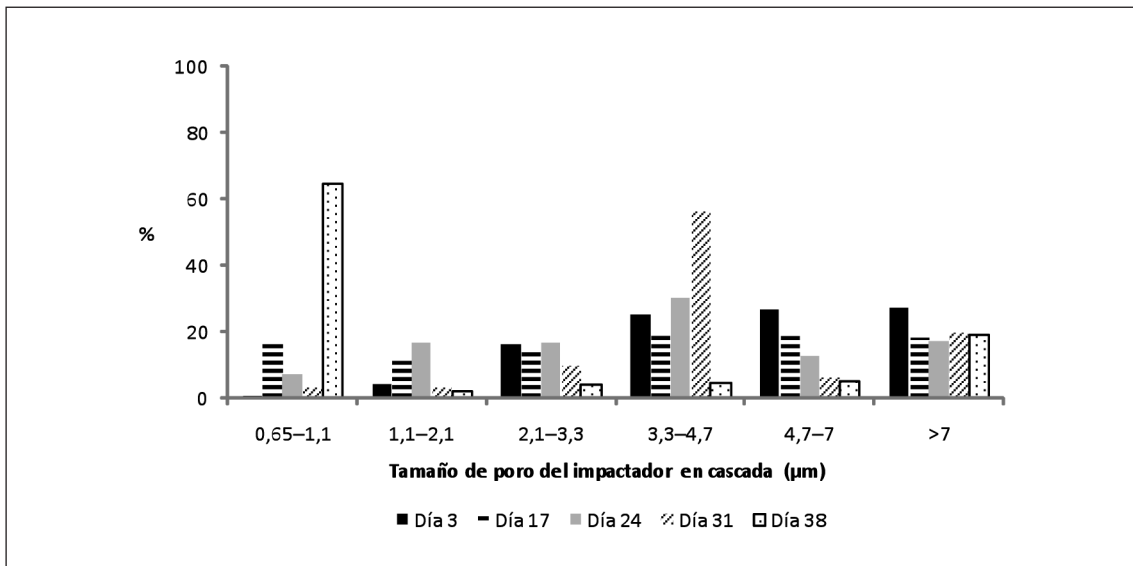


Figura 4. Porcentaje de microorganismos en cada uno de los niveles del andersen durante el ciclo de producción de broilers en la sala 2.
 Figure 4. Percentage of microorganism depending on particle size collecting with cascade impactor during the broiler production cycle in room 2.

rangos de tamaño de partícula entre 3,3 y 7 μm en la sala 2, excepto el día 38 en el que se obtuvo un 64% de bacterias aerobias mesófilas en los rangos de tamaño de partícula más pequeños (entre 0,65 y 1,1 μm).

Estos resultados indican una mayor asociación de las bacterias aerobias mesófilas a las partículas de tamaños entre 3,3 y 7 μm o superior, comparado con las más pequeñas (entre 0,65 y 3,3 μm). Lee et al. (2006) también encontraron una tendencia a la asociación de microorganismos con partículas de tamaños grandes.

Concentración y evolución del material particulado en el aire

Como se observa en la Figura 5 y Figura 6, las concentraciones de PM medidas con el TEOM tanto de PM_{2,5} como de PM₁₀ variaron en el tiempo en ambas salas. La concentración media para ambas salas fue de 0,019 mg/m³ para PM_{2,5} y 0,189 mg/m³ para PM₁₀. En todos los casos, la concentración del PM₁₀ fue superior a la concentración del PM_{2,5}, indicando una mayor concentración de partículas gruesas que finas.

Los niveles de PM fueron bajos durante toda la experiencia, aunque se observó una elevada variación diaria en las concentraciones que se refleja en una amplia desviación estándar de la media (Figura 5 y Figura 6). Esta variación es habitual y se debe a la fluctuación horaria de las concentraciones de PM a lo largo de un día. Los niveles de PM fueron muy inferiores a los valores máximos propuestos para protección de la salud de los tra-

bajadores y de los animales: (CIGR, 1992). Igualmente, no se superaron los valores máximos de concentración según criterios de salud humana en el ámbito laboral (HSE, 2007).

Además, la concentración de PM total obtenida en este estudio es inferior a la mayoría de resultados aportados por otros autores para el mismo tipo de alojamiento. La PM₁₀ indicada en los diferentes estudios es de 0,69 mg/m³ (Roumeliotis y Van Heyst, 2007) y de 1,21 mg/m³ (Cambra-López et al., 2009), y la PM_{2,5} es de 0,19 mg/m³ (Roumeliotis y Van Heyst, 2007) y de 0,079 mg/m³ (Cambra-López et al., 2009). Esta diferencia en las concentraciones puede ser debido a la baja densidad de animales de nuestro estudio en condiciones experimentales, comparado con otros estudios.

La concentración de PM aumentó a lo largo del ciclo. A partir del día 29 del ciclo, aumentó la tasa de ventilación (especialmente en la sala 1) y se puso en marcha la refrigeración evaporativa, disminuyendo la concentración de partículas, sobre todo la fracción más gruesa (PM₁₀). Esta evolución coincide con el comportamiento de las bacterias aerobias mesófilas obtenido con los borboteadores de aire (Figura 2). Se obtuvo una correlación positiva (Tabla 6) entre la concentración de PM y la concentración de bacterias aerobias mesófilas en el aire medida con los borboteadores. Los coeficientes de correlación variaron entre 0,78 y 0,89, para PM_{2,5} y PM₁₀, siendo superiores para PM_{2,5}. Estos resultados confirman la relación positiva entre estas variables descrita por otros autores (Bakutis et al., 2004).

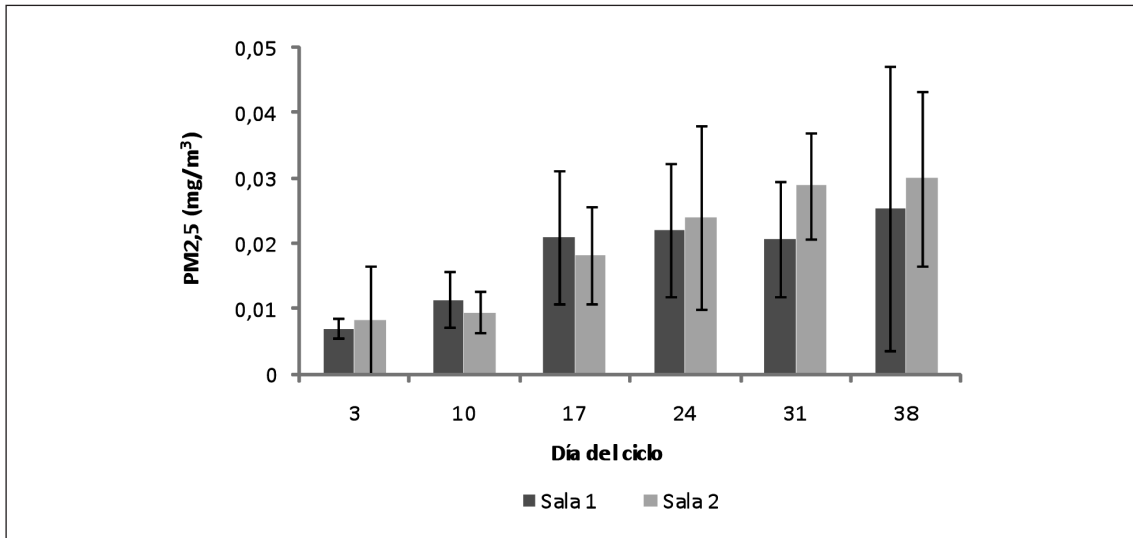


Figura 5. Concentración de PM2,5 medido con el equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM) a lo largo del ciclo de producción de broilers en cada sala. Las barras de error indican desviación estándar.
 Figure 5. Average concentration of PM2.5 in each room during the broiler production cycle using the continuous monitoring system TEOM. Error bars indicate standard deviation.

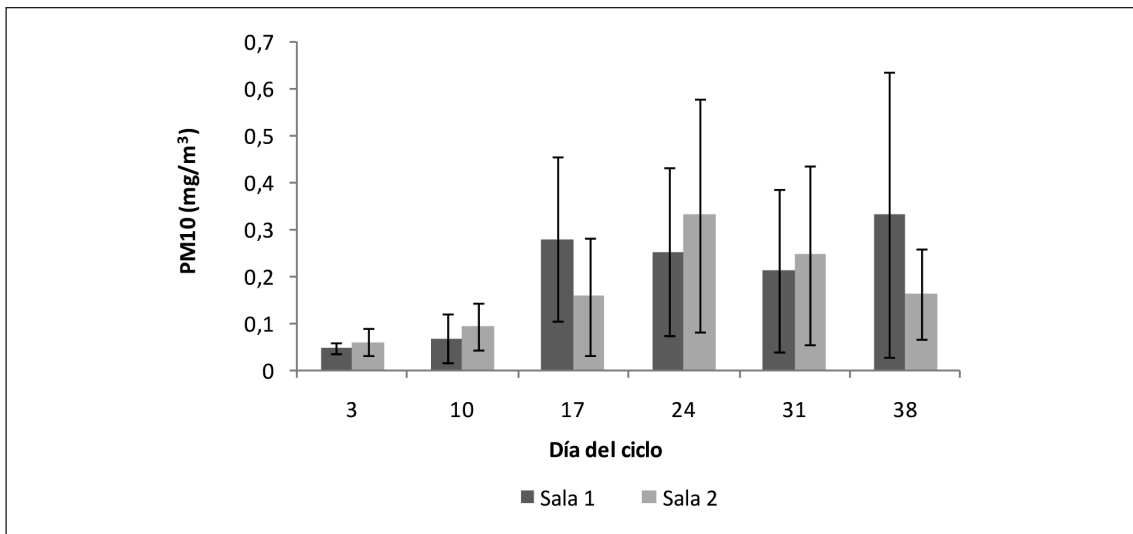


Figura 6. Concentración de PM10 medido con el equipo de muestreo en continuo de material particulado (TEOM) a lo largo del ciclo de producción de broilers en cada sala. Las barras de error indican desviación estándar.
 Figure 6. Average concentration of PM10 in each room during the broiler production cycle, using the continuous monitoring system TEOM. Error bars indicate standard deviation.

Tabla 6. Coeficiente de correlación entre la concentración de material particulado (PM_{2,5} y PM₁₀) y el recuento de bacterias aerobias mesófilas medido con los borboteadores

Table 6. Correlation coefficient between PM concentration (PM_{2.5} and PM₁₀) and aerobic mesophilic bacteria concentration using impingers

	Sala 1	Sala 2
PM _{2.5}	0,89	0,89
PM ₁₀	0,78	0,86

Conclusiones

La distribución espacial de las bacterias aerobias mesófilas en el aire varió a lo largo del ciclo. Al comienzo del ciclo (día 3), se observó un mayor número de bacterias ($p < 0,001$) a la altura de los animales (30 cm del suelo) respecto a alturas mayores (entre 150 y 200 cm del suelo) indicando un gradiente en su concentración. Sin embargo, estas diferencias desaparecieron a partir del día 17 del ciclo, probablemente debido a un aumento de las concentraciones de bacterias aerobias mesófilas totales y a una distribución más homogénea de éstas en el aire.

Las concentraciones de bacterias aerobias mesófilas medidas en el aire variaron entre 3 log UFC/m³ y 6,53 log UFC/m³. Las concentraciones aumentaron semanalmente, hasta alcanzar el máximo el día 24 del ciclo. A partir de entonces, y probablemente debido al aumento de la tasa de ventilación, los recuentos disminuyeron aunque se mantuvieron con valores elevados.

Entre el 42% y el 96% de las bacterias aerobias mesófilas se encontraron en los rangos de tamaño de partícula entre 3,3 y más de 7 µm, comparado con las más pequeñas (entre 0,65 y 3,3 µm).

La concentración media de PM en el aire fue de 0,019 mg/m³ para PM_{2,5} y 0,189 mg/m³ para PM₁₀. La evolución de las concentra-

ciones de PM a lo largo del ciclo fue similar a la de las bacterias aerobias mesófilas en el aire. A partir del día 24, y probablemente debido al aumento de la tasa de ventilación, las concentraciones, especialmente de la fracción más gruesa (PM₁₀) disminuyeron. Existe una correlación positiva (coeficiente de correlación entre 0,78 y 0,89) entre las concentraciones de PM_{2,5} y PM₁₀ y las de bacterias aerobias mesófilas.

Los resultados de este estudio son útiles para el desarrollo de medidas de reducción del PM así como de bioaerosoles en granjas de broilers, y contribuyen a entender su comportamiento en el aire.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida a través del Proyecto GASFARM-2 (AGL2008-04125) del Ministerio de Ciencia e Innovación, coordinada por el prof. Antonio Torres. También agradecen al Centro de Investigación y Tecnología Animal del IVIA por ofrecernos las instalaciones y por el apoyo durante el ensayo. Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Fernando Estellés por su ayuda en el cálculo del balance de CO₂ y al grupo de Wageningen UR Livestock Research (Países Bajos) por la cesión del impactador en cascada.

Bibliografía

- Bakutis B, Monstvilienė E, Januskeviciene G, 2004. *Analyses of airborne contamination with bacteria, endotoxins and dust in livestock barns and poultry houses*. Acta Veterinaria Brno 73(2), 283-289.
- Calvet S, Cambra-López M, Estellés F, Torres AG, Van den Weghe H, 2010. *The influence of animal activity and litter on carbon dioxide balances to determine ventilation flow in broiler production*. XVIIth World congress of the International Commission of Agricultural Engineering (CIGR) Quebec, Canadá (Junio 13-17, 2010).
- Cambra-López M, Hermosilla T, Lai HTL, Aarnink AJA, Ogink NWM, 2011a. *Particulate matter emitted from poultry and pig houses: source identification and quantification*. Transactions of the ASABE 54(2), 629-642.
- Cambra-López M, Torres AG, Aarnink AJA, Ogink NWM, 2011b. *Source analysis of fine and coarse particulate matter from livestock houses*. Atmospheric Environment 45, 694-707.
- Cambra-López M, Winkel A, van Harn J, Ogink NWM, Aarnink AJA, 2009. *Ionization for reducing particulate matter emissions from poultry houses*. Transactions of the ASABE 52(5), 1757-1771.
- Chinivasagam HN, Tran L, Maddock L, Gale A, Blackall PJ, 2009. *Mechanically ventilated broiler sheds: a possible source of aerosolized Salmonella, Campylobacter, and Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 75(23), 7417-7425.
- CIGR, 1992. *Climatization of animal houses*. Second Report of the Working Group on Climatization of Animal Houses, Centre for Climatization of Animal Houses., 1-147. Ghent, Bélgica.
- Cox CS, Wathes C, 1995. *Bioaerosols handbook*. Editors: Cox, C.S. y Wathes, C. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- Donham KJ, 1991. *Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine*. American Journal of Veterinary Research 52(10), 1723-1730.
- Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D, 2003. *Bioaerosol health effects and exposure assessment: Progress and prospects*. Annals of Occupational Hygiene 47(3), 187-200.
- HSE, 2007. *List of approved workplace exposure limits*. Health & Safety Executive, 1-18.
- Lee SA, Adhikari A, Grinshpun SA, McKay R, Shukla R, Reponen T, 2006. *Personal exposure to airborne dust and microorganisms in agricultural environments*. Journal of Occupational and Environmental Hygiene 3(3), 118-130.
- Matkovic K, Vucemilo M, Vinkovic B, Seol B, Pavicic Z, Matkovic S, 2007. *Qualitative structure of airborne bacteria and fungi in dairy barn and nearby environment*. Czech Journal of Animal Science 52, 249-254.
- Millner PD, 2009. *Bioaerosols associated with animal production operations*. Bioresource Technology 100(22), 5379-5385.
- Oppliger A, 2008. *Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification*. Annals of occupational hygiene 52(5), 405-412.
- Roumeliotis TS, Van Heyst BJ, 2007. *Size fractionated particulate matter emissions from a broiler house in Southern Ontario, Canada*. Science of the Total Environment 383, 174-182.
- Saleh M, Seedorf J, Hartung J, 2005. *Influence of animal age and season on bioaerosol concentrations in a broiler house*. Animals and Environment, Volume 2: Proceedings of the XIIth ISAH Congress on Animal Hygiene, Warsaw, Poland, 4-8 September 2005.
- Seedorf J, Hartung J, Schroder M, Linkert KH, Phillips VR, Holden MR, Sneath RW, Short JL, White RP, Pedersen S, Takai H, Johnsen JO, Metz JHM, Koerkamp PWGG, Uenk GH, Wathes CM, 1998. *Concentrations and emissions of airborne endotoxins and microorganisms in livestock buildings in Northern Europe*. Journal of Agricultural Engineering Research 70(1), 97-109.
- Takai H, Pedersen S, Johnsen JO, Metz JHM, Koerkamp PWGG, Uenk GH, Phillips VR, Hol-

- den MR, Sneath RW, Short JL, White RP, Hartung J, Seedorf J, Schroder M, Linkert KH, Wathes CM, 1998. *Concentrations and emissions of airborne dust in livestock buildings in Northern Europe*. Journal of Agricultural Engineering Research 70(1), 59-77.
- Zhao Y, Aarnink AJA, Doornenbal P, Huynh TTT, Koerkamp PWGG, de Jong MCM, Landman WJM, 2011a. *Investigation of the efficiencies of bioaerosol samplers for collecting aerosolized bacteria using a fluorescent tracer. I: effects of non-sampling processes on bacterial Culturability*. Aerosol Science and Technology 45(3), 423-431.
- Zhao Y, Aarnink AJA, Doornenbal P, Huynh TTT, Koerkamp PWGG, Landman WJM, de Jong MCM, 2011b. *Investigation of the efficiencies of bioaerosol samplers for collecting aerosolized bacteria using a fluorescent tracer. II: sampling efficiency and half-life time*. Aerosol Science and Technology 45(3), 432-442.
- Zucker BA, Trojan S, Muller W, 2000. *Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses*. Journal of Veterinary Medicine Series B, Infections Diseases and Veterinary Public Health 47(1), 37-46.

(Aceptado para publicación el 13 de mayo de 2011)