

AVALUACIÓ DE BIOCONSERVANTS APLICATS EN HAMBURGUESES MIXTES DE CARN DE VEDELLA I PORC

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Treball presentat per la superació dels 15 crèdits del Mòdul de Treball Fi de Màster del
Màster Oficial en Qualitat d'Aliments d'Origen Animal.

Mònica Vega Boada

Presentat el 15 de setembre de 2016

INFORME DE LA DIRECTORA/TUTORA DEL TREBALL

Montserrat Mor-Mur en qualitat de directora i Eva Campos en qualitat de tutora

INFORMEN

Que el treball d'investigació titulat: "Avaluació de bioconservants aplicats en hamburgueses mixtes de carn de vedella i porc" ha estat realitzat sota la nostra supervisió o tutela per la Srta. Mònica Vega Boada dins del mòdul de Treball Fi de Màster del Màster Oficial de Qualitat d'Aliments d'Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

A _____ el _____ de _____ de 2016

Firma

AGRAÏMENTS

Primer de tot agraeixo a Paymsa, per haver-me permès realitzar el treball a les seves instal·lacions; en especial al personal del Departament de qualitat per haver-me ajudat i per haver estat la meva mà dreta als assajos de microbiologia. També al personal de la planta pilot per deixar-me un forat de taula per fer les hamburgueses. I per últim, però no menys important, a l'Eva i en Jaume per aconsellar-me i donar-me suport.

També agrair a la meva tutora, la Montse per recomanar-me sense embuts les correccions que més s'hi esqueien i a totes aquelles persones del Departament de Ciència Animal i dels Aliments que en algun moment em van donar un cop de mà.

Com no, també agrair a la meva feina, GIMAVE, per haver-me donat les facilitats per adaptar els horaris a les necessitats que aquest estudi, i també el màster, requerien.

Finalment, a tu, Cesc, que has sigut pacient i m'has ajudat perquè jo pogués arribar fins aquí.

LLISTA D'ABREVIACIONS

B: blanc

P: patró

BC: bioconservant

BGBL: brilliant green bile lactose

CECT: colección espanyola de cultivos tipo

N: absència

NMP: nombre més probable

PCA: plate count agar

RAM: recompte d'aerobis mesòfils

S: presència

TSB: Tryptic Soy Broth

VRBG: violet red bile glucose

UAB: Universitat Autònoma de Barcelona

UFC: unitats formadores de colònies

Índex

1. RESUM	1
2. INTRODUCCIÓ	2
2.1. CARACTERÍSTIQUES DELS PREPARATS CARNIS	2
2.2. CONSERVADORS MÉS ESTESOS: ELS SULFITS	3
2.3. MILLORES EN LA CONSERVACIÓ: ELS BIOCONSERVANTS	4
2.4. ALTRES ESTUDIS: SINÈRGIES	5
2.5. OBJECTIU	5
3. MATERIALS I MÈTODES	6
3.1. PREPARACIÓ DE LES HAMBURGUESES	6
3.2. SELECCIÓ DE BACTÈRIES BIOCONSERVANTS	7
3.2.1. <i>Anàlisis microbiològics</i>	8
3.3. INOCULACIÓ DE PATÒGENS	8
3.3.1. <i>Determinacions en les hamburgueses inoculades amb patògens</i>	9
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	11
4.1. PROVES DE COLOR	11
4.2. SELECCIÓ DE BACTÈRIES BIOCONSERVANTS: ANÀLISIS MICROBIOLÒGICS	12
4.2.1. <i>Resultats del recompte d'aerobis mesòfils</i>	12
4.2.2. <i>Resultats del recompte d'enterobactèries</i>	12
4.2.3. <i>Resultats del recompte de coliforms totals i fecals</i>	13
4.2.4. <i>Resultats de la detecció d'E. coli</i>	14
4.2.5. <i>Resultats de la detecció de Salmonella spp.</i>	15
4.3. EFECTES DE LES BACTÈRIES BIOCONSERVANTS CONTRA PATÒGENS	15
4.4. REFLEXIONS PER A FUTURS ESTUDIS	16
5. CONCLUSIONS	18
6. BIBLIOGRAFIA	19
7. ANNEXES	22
7.1. FIGURES	22
7.2. TAULES	23

1. RESUM

En els últims anys, ha augmentat la preocupació de la gent per consumir aliments segurs i sans. Aquesta preocupació s'ha traduït en què els consumidors cada cop busquen més productes amb el mínim, o inclús sense additius però conservant les característiques organolèptiques i de vida útil dels productes que sí en porten. En conseqüència, les indústries alimentàries estan invertint en la recerca de noves substàncies que permetin crear aliments segurs mantenint les característiques organolèptiques. Una d'aquestes noves substàncies són els bioconservants o bacteriocines (BC).

En el següent estudi, es va avaluar l'efecte bioconservant de diverses bacteries àcid-làcties (BAL) aplicades en hamburgueses mixtes de carn de vedella i porc. Per dur-ho a terme, es van realitzar proves de color i microbiològiques en hamburgueses inoculades amb BAL sospitoses de produir BC. D'aquestes se'n va escollir la que tenia uns efectes més similars al patró (amb sulfits) per aplicar-la en hamburgueses inoculades amb microorganismes patògens productors de toxiinfeccions alimentàries -unes amb *Escherichia coli* 10526 CECT, unes altres amb *Salmonella enterica* subespècie *enterica* serovar Typhimurium 722 CECT i per últim unes amb *Listeria innocua* 4030 CECT- i es va observar el seu creixement per avaluar l'efecte conservador de la BAL.

Per les mostres analitzades, no s'observen diferències entre les mostres blanc, patró o les inoculades amb BAL que ens indiquin que poden tenir efecte BC. Aquests resultats es poden explicar perquè només es va poder realitzar una rèplica de cada prova o perquè les BAL no van tenir les condicions òptimes per a créixer.

2. INTRODUCCIÓ

Segons dades presentades per la Organització Mundial de la Salut (OMS) pel Dia mundial de salut del 2015, anualment moren 351 000 persones a tot el món degut a malalties entèriques provocades per intoxicacions alimentàries. D'aquestes morts, destaquen com a agents causants *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* enteropatogènica i virus del gènere *Norovirus*. La directora general de la OMS Margaret Chan explica que: "la producció d'aliments s'ha industrialitzat i el seu comerç i distribució s'ha globalitzat." (...) "Aquests canvis introdueixen noves oportunitats perquè els aliments es contaminin amb bacteries nocives, virus, paràsits o substàncies químiques." (Anònim, 2015)

Segons García *et al.* (2010) dins de la Unió Europea destaquen com a agents patògens bacteries dels gèneres *Campylobacter*, *Salmonella* i *Listeria*.

A més del problema sanitari, els aliments no innocus també plantegen importants costos econòmics, sobretot en un món globalitzat com el nostre. És l'exemple del brot provocat per *E. coli* l'any 2011 a Alemanya que, segons els informes dels Estats Units, va causar 1.3 bilions de dòlars en pèrdues per als agricultors i les indústries, i 236 milions de dòlars en pagaments d'ajuda d'emergència als 22 estats membres de la Unió Europea. (Anònim, 2015)

Aquests fets són un exemple de per què ha augmentat l'interès en buscar mètodes que assegurin la innocuïtat dels aliments.

2.1. Característiques dels preparats carnis

Tal i com explica Hugas (1998), per les seves propietats fisicoquímiques -alta a_w , pH al voltant de 5.5 i gran varietat de nutrients-, la carn és molt sensible a les alteracions microbiològiques. Per això és un dels productes que sol estar involucrat en intoxicacions alimentàries; especialment, els preparats de carn picada com les hamburgueses o les salsitxes.

En general, en peces senceres de carn (com un llom) la part externa és la que està exposada a la contaminació però el seu interior no conté bacteries. En canvi, en els preparats carnis on es pica la carn els microorganismes externs es barregen amb tota la massa càrnia, contaminant

tota la carn. A més, s'ha de tenir en compte que per fer un preparat carni la carn es manipula més que una porció de carn fresca i una major manipulació porta a un augment del risc de contaminació. A nivell microbiològic, aquesta contaminació pot ser de dos tipus: alterant o patògena.

La contaminació alterant sol venir donada per bacteries àcid-làcties (BAL) que formen part de la microflora de la carn i, tot i no ser patògenes, amb el temps provoquen l'aparició de llim a la superfície del producte així com olors i sabors estranys, principalment deguts a la producció d'àcid làctic. Segons la definició de Ramírez *et al.* (2011), les BAL són cocs o bacils Gram positives, generalment mesòfiles - encara que n'hi ha que poden créixer a 5 °C i d'altres a 45 °C (Mora i García, 2007)-, no esporulades, aerotolerants o microaeròfiles, que produeixen àcid làctic com a únic o principal producte de la fermentació de carbohidrats i poden viure amb un pH d'entre 3.2 i 9.6. Aquestes característiques les permeten créixer en aliments tan variats com la llet, cereals o la carn. Els gèneres més representatius de les BAL són: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc*.

Per contra, la contaminació amb patògens sol ser originada per microorganismes mesòfils patògens com *Salmonella* spp., *E. coli* enterohemorràgica (O 157:H7) y *Listeria monocytogenes*, entre altres; provocant les anomenades toxineccions alimentàries (TIA) a qui ingereix l'aliment contaminat (Vázquez *et al.*, 2009). El gran inconvenient d'aquestes contaminacions és que, tot i estar contaminat, l'aliment pot presentar una aparença normal i contenir suficient patogen o la toxina d'aquest com per provocar simptomatologia al consumidor.

2.2. Conservadors més estesos: els sulfits

Fins ara, per evitar el creixement de bacteris en els preparats carnis s'han utilitzat conservadors, principalment els sulfits. Els sulfits engloben un conjunt d'additius autoritzats per la Unió Europea -com el sulfit sòdic (E-221) o el metabisulfit potàsic (E-224)- amb acció inhibidòria sobre els microorganismes i efecte antioxidant. Per tant, els sulfits eviten la proliferació dels microorganismes i l'enfosquiment dels productes on els introduïm.

Tot i que aquests additius s'han usat des de fa molts anys i en productes tan diferents com el vi, els preparats carnis o les galetes tenen certs inconvenients a tenir en compte. Hi ha una part de la població que és sensible als sulfits, provocant-los reaccions asmàtiques o urticàries, entre d'altres. A més, els sulfits reaccionen amb la vitamina B1, descomponent-la i, en conseqüència reduint el seu contingut en els aliments que la contenen -com en el cas de la carn- (Ávila, 2011).

2.3. Millores en la conservació: els bioconservants

Com remarquen Hugas (1998), Deegan *et al.* (2006) i Beristain-Bouza (2012) actualment, els consumidors es preocupen molt més d'allò que mengen i per això busquen productes més segurs i estables amb una major vida útil però sense conservadors químics (és a dir d'etiqueta verda). Degut a aquest rebuig creixent dels additius per part dels consumidors i als efectes adversos que poden provocar a una part de la població, s'estan buscant alternatives a l'ús dels sulfits però que donin la mateixa seguretat que ells front a patògens.

Alguns exemples són nous mètodes d'envasat (envasos actius), nous tractaments (ultra alta pressió hidrostàtica) i noves substàncies (bioconservants). Nosaltres ens centrarem en aquests últims.

Els bioconservants o bacteriocines (BC) es poden considerar conservadors naturals que complirien els requeriments dits anteriorment -són naturals i segures, ja que s'assumeix que són degradades per les proteases del tracte gastrointestinal (Lücke, 2000; Fangio i Fritz, 2014)-. Varis autors (Cleveland *et al.*, 2001; Gálvez *et al.*, 2007; Mora i García, 2007; García *et al.*, 2010; i Grande *et al.*, 2011) coincideixen a definir les BC com a pèptids o proteïnes sintetitzades als ribosomes d'algunes BAL, amb activitat antimicrobiana i termostables (algunes aguanten tractaments de 121 °C, 15 minuts). El seu mecanisme d'acció no provoca resistències creuades amb antibiòtics i tampoc provoquen efectes a qui les ingereix (són reconegudes com a substàncies GRAS -Beristain-Bauza *et al.*, 2012-). Aquestes característiques les poden fer útils en la indústria alimentària per ajudar a reduir l'addició de conservadors químics i la intensitat dels tractaments tèrmics; per tant, es poden aplicar per fabricar aliments que es conservin de forma natural (d'etiqueta verda) i amb unes propietats organolèptiques i nutricionals més bones.

S'ha estudiat molt l'aplicació de bioconservants en productes carnis cuits com el pernil dolç però hi ha pocs estudis de la seva aplicació en preparats carnis. Una de les explicacions és que en productes cuits l'efectivitat dels bioconservants és més elevada ja que el tractament tèrmic que s'aplica elimina gran part de la flora present i permet que els bioconservants actuïn més eficaçment.

A dia d'avui, només es comercialitzen i són aptes per ús alimentari dues bacteriocines: la nisina (NisaplinTM; product description-PD45003-7EN; Danisco, Copenhagen, Denmark), produïda per *Lactococcus lactis* i la pediocina PA-1 (ALTATM 2431; Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Ireland), produïda per *Pediococcus acidilactici* (Deegan *et al.*, 2006). Aquesta última, la pediocina, té un ús limitat en aliments ja que la Food and Drug Administration (FDA) encara no li ha atorgat l'estatus GRAS (Beristain-Bauza *et al.*, 2012).

2.4. Altres estudis: Sinèrgies

Degut a la complexitat dels aliments, és molt difícil prevenir el creixement de patògens només aplicant una BC. Per això una altra via d'investigació és l'ús combinat de BC amb altres substàncies amb efecte antimicrobià, com els olis essencials o extractes vegetals (Rai i Chikindas, 2011; Zhou *et al.*, 2010) o amb tractaments com la ultra alta pressió o els polsos elèctrics (Grande *et al.*, 2011).

N'és un exemple l'estudi realitzat per Rodríguez *et al.* (2005) on s'estudia l'efecte antimicrobià dels tractaments d'alta pressió contra *E. coli* O157:H7 en formatge combinats amb l'addició de BAL productores de bacteriocines. En aquest cas, s'observa un augment de la inhibició d'*E. coli* quan es combinen els dos tractaments.

2.5. Objectiu

En aquest estudi es van fer assajos amb vàries soques de BAL per observar si podien tenir utilitat com a bioconservant en hamburgueses mixtes de porc i vedella. Es va observar si tenen algun efecte vers tres de les bactèries causants de TIA: *Listeria monocytogenes*, *E. coli* i *Salmonella* spp.

3. MATERIALS I MÈTODES

Per fer l'estudi es van realitzar dos tipus d'assajos; al primer es van avaluar vàries bactèries sospitoses de tenir efecte bioconservant en hamburgueses mixtes de carn de vedella i porc a fi de seleccionar aquelles que tinguessin un efecte similar a la mostra patró (hamburgueses amb sulfits), i al segon es va avaluar l'efecte bioconservant de les bactèries seleccionades en hamburgueses contaminades amb *E. coli*, *Salmonella* i *Listeria*.

Per tots dos assajos, el dia 0 es van fer les hamburgueses que es necessitarien per les determinacions a dies 0, 2, 7 i 9 de cada tractament avaluat -blanc (B), patró (P) i bioconservant/s-. Els pesos i proporcions indicades a continuació es corresponen amb les utilitzades per fer l'estudi d'una rèplica d'un sol tractament des del dia 0 al 9 i s'especificaran, en cas necessari, les variacions en els altres tractaments. Per motius logístics (espai a les estufes, disponibilitat de material i temps), només es va realitzar una rèplica de cada prova.

3.1. Preparació de les hamburgueses

Tot el procés es va realitzar a la planta pilot de Preparados Aditivos y Materias Primas, S.A.; "PAYMSA" (St. Quirze del Vallès, Espanya).

Les hamburgueses B es van fer amb carn del proveïdor Embutidos Subirats S.A, (Sta. Perpètua de Mogoda, Espanya) en la proporció següent: 40% de carn magra congelada de vedella, 40% de carn magra congelada de porc i 10% de panxeta congelada de porc. A part de la carn, les hamburgueses també contenien un 7.5% d'aigua potable de l'aixeta i un 2.5% del preparat d'additius següent: 68% de sal, 12% de dextrosa, 6% de dextrina, 4% de citrat sòdic, 4% de pebre negre en pols, 4% d'aroma de pebre blanc i 2% d'ascorbat sòdic; tots ells subministrats també per Paymsa.

Un cop pesada, la carn es va posar dins d'un bol al microones, en mode descongelació, durant 10 minuts perquè perdés la fermesa però sense arribar a descongelar-se totalment. Es van tallar a trossos d'uns 5 cm i es van introduir a la picadora (Mainca PM-98), amb placa de 5 mm, de manera que es barreguessin trossos dels 3 tipus de carn. La carn sortia de la picadora al

mateix bol que s'havia utilitzat per descongelar la carn. Sobre aquesta carn picada es va afegir la mescla d'additius prèviament dissolta a l'aigua. Tota la massa de carn picada, additius i aigua es va amassar manualment, amb guants per no contaminar la mostra, aixecant de tant en tant la massa i llançant-la contra el bol per ajudar a incorporar millor els additius.

Amb aquesta formulació es van obtenir 300 g de massa d'hamburguesa de la mostra corresponent al blanc, que van servir per preparar 3 hamburgueses de 90 g amb l'ajuda un formador d'hamburgueses manual (La Pressella, Rigamonti Hamburguer Press) i dos plàstics de cel·lofana de la casa Troquemor, S.L. (Paterna, Espanya), un a cada cara de l'hamburguesa. Un cop formades les 3 hamburgueses, 1 d'elles es va tallar per la meitat per obtenir 4 porcions (2 meitats i dues hamburgueses senceres). Cada part es va col·locar a un plat de plàstic diferent, cadascun marcat amb els números 0, 2, 7 i 9 (corresponents als dies de les determinacions); es va tapar amb plàstic film i es va introduir a la cambra frigorífica regulada a 4 ± 1 °C.

Per fer la mostra P, es va seguir el mateix procediment afegint a l'anterior formulació d'additius 0.3 g de sulfit sòdic (Paymsa).

Per últim, per preparar les hamburgueses inoculades amb BC es va tenir en compte la concentració que indicava el fabricant (10^{11} UFC/g de bioconservant liofilitzat) i la concentració final que es volia obtenir a l'hamburguesa (per a cada possible bioconservant es van provar les concentracions de 10^9 , 10^7 , 10^5 i 10^3). Així doncs, per obtenir una concentració final de 10^9 UFC/100 g d'hamburguesa es van afegir 3 g del bioconservant en la solució d'aigua i additius per afegir-los als 300 g de carn picada. D'aquesta manera es va fer una dilució 1:100. Per obtenir una concentració final de 10^7 UFC prèviament es va preparar una dilució 1:100 del bioconservant amb aigua de l'aixeta. Es van afegir 3 g d'aquesta solució a la mescla d'additius i després es va afegir l'aigua restant fins arribar al 7.5% d'aigua afegida. D'aquesta manera es va mantenir la quantitat d'aigua inclosa.

3.2. Selecció de bacteries bioconservants

L'empresa Biopolis S.L (Paterna, Espanya) va facilitar 8 bioconservants diferents: BPL7 (*Lactobacillus plantarum*), BPL8 (*Lactobacillus rhamnosus*), BPL9 (*Lactobacillus*

plantarum), BPL22 (*Lactobacillus pentosus*), BPL24 (*Lactobacillus casei*), BPL34 (*Lactobacillus fermentum*), BPL37 (*Lactobacillus rhamnosus*), BPL49 (*Lactobacillus plantarum*).

Per limitació d'espai i de temps, es va fer una primera tria dels microorganismes que s'estudiarien: es van preparar hamburgueses inoculades a diferents concentracions i es van fer proves de color visualment i utilitzant un colorímetre (Chroma Meter, Konika Minolta, Madrid, Espanya), comparant l'evolució del color de les hamburgueses inoculades amb el patró des de dia 0 fins a l'11. Es van fer lectures amb el colorímetre els dies 2 i 4, i el dia 11 es va fer una valoració visual. Aquells microorganismes que permetessin mantenir un color més similar al patró serien els que es provarien.

3.2.1. Anàlisis microbiològics

Es van fer recomptes d'aerobis mesòfils (PCA; Cultimed, 37 °C, 48 h), recompte d'enterobactèries en placa de VRBG (Laboratorios Conda, 37 °C, 48 h) , nombre més probable per gram (NMP/g) de coliforms totals i fecals en tubs de BGBL (Laboratorios Conda; 37 °C, 48 h per coliforms fecals i 45 °C, 24h pels fecals), presència/ absència d'*E. coli* en medi Eosina blau de metilè segons Levine (Cultimed, 45 °C, 24h) i presència / absència de *Salmonella* spp. en 25 g d'hamburguesa, segons protocol intern número PR: 101 de Paymsa. Aquestes determinacions es van fer a dia 0, 2, 7 i 9 pels diferents tractaments.

3.3. Inoculació de patògens

Tot el procediment de preparació dels inòculs, inoculació a les hamburgueses i les anàlisis posteriors van ser realitzades al laboratori de Bioseguretat de Nivell 3 del Departament de Tecnologia dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la UAB.

Es va decidir inocular *Listeria*, *E. coli* i *Salmonella* a les hamburgueses a partir de cultius purs de les següents soques: *Listeria innocua* 4030 CECT, *Escherichia coli* 10526 CECT, *Salmonella enterica* subespècie *enterica* serovar Typhimurium 722 CECT; sembrats en tub inclinat i emmagatzemats en refrigeració. Per revifar-los, amb una nansa de punta rodona es va agafar una petita part de cada cultiu i es va dissoldre en medi TSB (Tryptic soy broth). Es va preparar un tub per cada microorganisme i es van introduir a una estufa a 37 °C. Al cap de

24 h d'incubació es va traspasar 1 ml de cada tub a 3 tubs de TSB estèril per fer una segona incubació de 24 h per a què els tres patògens estiguessin en fase estacionària a l'hora de ser inoculats a les hamburgueses. En aquest punt, i observant la turbolesa, es va estimar que la concentració de patògen a cada tub era de 10^9 .

Es van inocular les hamburgueses amb una concentració aproximada de 10^5 UFC/g hamburguesa. D'aquesta manera es podria observar si el patògen es veia afectat (s'observaria disminució de la concentració) o, per contra, no estava inhibit i podia créixer sense cap inconvenient (la concentració augmentaria). Per tant, es van haver de fer dilucions dels tubs de cultius purs fins a obtenir una concentració de 10^7 sabent que quan s'inocuessin a la massa d'hamburguesa hi hauria una altra dilució de dues unitats logarítmiques (ja que es va seguir el mateix procediment que l'usat per inocular els bioconservants: 3 g de solució amb l'inòcul en 300 g de massa per hamburguesa).

Per fer les inoculacions es van preparar 3 masses, una per cada tractament: blanc, patró i bioconservant BPL22. Cadascuna d'elles es va dividir en 4 porcions de 300 g corresponents a hamburgueses sense inocular amb *L. innocua*, hamburgueses amb *E. coli*, i hamburgueses amb *S. Typhimurium*.

Un cop les masses de les hamburgueses dels 3 tractaments van ser inoculades amb els 3 patògens, es van formar les hamburgueses tal com s'ha explicat anteriorment, es van distribuir en plats de plàstic coberts amb plàstic i es van emmagatzemar a 4 ± 2 °C.

3.3.1. Determinacions en les hamburgueses inoculades amb patògens

En les hamburgueses que no havien estat inoculades amb patògens es van realitzar les mateixes determinacions microbiològiques que anteriorment.

Quant a les hamburgueses inoculades, es van utilitzar medis cromogènics per tal de poder fer recompte de les unitats formadores de colònies presents: medi Aloa (Biomerieux, Madrid, Espanya) per al recompte de *L. innocua*, on *Listeria* creix en forma de colònies verdes degut a la seva activitat β -glucosidasa; per *Salmonella*, es va utilitzar el medi ChromID Salmonella Agar (Biomerieux) on *Salmonella* creix en forma de colònies liloses degut a la seva activitat esterasa; per *E. coli* es va utilitzar el medi ChromID Coli (Biomerieux) que presenta un

substrat cromògen que reacciona davant l'activitat β -glucoronidasa de *E. coli* fent que les colònies apareguin de color lilós (figura 01).

Per fer les determinacions, a dia 0 es va fer un banc de dilucions amb aigua de peptona. Un cop obtingudes, es va procedir a sembrar per duplicat 0.1 ml de la dilució 10^{-3} a cada placa tenint en compte el patogen inoculat. Es van incubar durant 24 h a 37 °C, a excepció a les plaques d'Aloa que es van incubar 48 h. Pels següents dies es va realitzar el mateix procediment adaptant el nombre de dilucions del banc de dilucions segons els resultats obtinguts a la prova anterior.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Proves de color

En general, a mesura que van anar passant els dies les hamburgueses van anar canviant de color: primer es van anar enfosquint i després va anar apareixent llim a la superfície. Aquest canvi d'aparença també és descrit per Vázquez *et al.* (2009), que observa que a mesura que passa al temps disminueix l'acceptabilitat degut als canvis en l'aparença, color i aroma que succeeixen. Aquests fets també els corrobora Gálvez *et al.*, 2008 afirmant que les BA representen la majoria de bacteries alterants, provocant defectes com l'acidificació, males olors, descoloració, producció de gas i llim així com una disminució del pH.

Dels 8 BC avaluats (taula 01) es va observar que n'hi havia 4 (BPL22, BPL34, BPL37, BPL49) on l'enfosquiment de la carn era inferior a la resta i, per tant, s'assemblaven més al patró. D'altra banda, es va observar que les hamburgueses que s'havien inoculat amb una concentració de 10^7 UFC/g eren les que presentaven menys presència de llim i enfosquiment. Per tant, es va deduir que aquesta concentració era suficient per limitar el creixement d'altres microorganismes (patògens i/o alterants) però no tan alta com per provocar alteracions organolèptiques (llim i olors àcides).

Tal i com es pot observar a la figura 02, a dia 2 ja es veia una clara diferència de color entre les hamburgueses B, P i la que contenia BC. Degut a l'acció antioxidant dels sulfits, l'hamburguesa P havia mantingut el color vermell intens mentre que les altres dues s'havien enfosquit. A dia 11 totes 3 hamburgueses s'havien enfosquit i s'observava llim a l'hamburguesa inoculada amb BC (figura 03).

4.2. Selecció de bacteries bioconservants: anàlisi microbiològics

Per fer les proves microbiològiques es van avaluar els 4 bioconservants amb els millors resultats a la prova de color: BPL22, BPL34, BPL37, BPL49.

4.2.1. Resultats del recompte d'aerobis mesòfils

Tal i com s'observa a la taula 02, els valors inicials d'aerobis mesòfils en la mostra B i la P van ser de 10^5 i 2.3×10^5 UFC/g. Aquests valors estan al llindar dels valors permesos pel Reglament relatiu als criteris microbiològics (Anònim, 2005) que com a màxim permet 5×10^6 UFC/g, i ens indiquen que les superfícies on s'han produït no estaven suficientment netes, que les carns han estat massa temps a temperatures elevades o que la càrrega microbiana de les carns ja era elevada quan les va servir el proveïdor. Una altra explicació d'aquesta càrrega inicial elevada és una possible contaminació durant l'elaboració, ja que la planta pilot de Paymsa no estava a temperatura controlada i alhora que s'estaven produint les hamburgueses s'estaven elaborant altres productes.

Quant a les hamburgueses amb bioconservants, s'observa que, del dia 0 al 9, els valors d'aerobis mesòfils es trobaven entre una i tres unitats logarítmiques per sobre dels valors que presenten les mostres B i P. Contràriament a aquests resultats, trobem l'estudi realitzat per Fangio i Fritz (2014), on ruixen carn bovina amb un extracte de BC produït per *Bacillus cereus* P9, i observen que els recomptes d'aerobis mesòfils a dia 6 són inferiors en la carn ruixada que en la control (no ruixada amb BC). És a dir, que la substància BC utilitzada presentava cert efecte inhibitori a dia 6. Tot i això, al final de l'experiment (a dia 12) no es van observar diferències significatives entre les mostres tractades i les control.

Per tant, pel que fa a recompte d'aerobis mesòfils es pot dir que les mostres B i P (entre elles no hi ha diferències) tenen recomptes inferiors a les mostres inoculades.

4.2.2. Resultats del recompte d'enterobactèries

En les mostres B i les inoculades amb BPL34 i BPL37 hi va haver un creixement d'enterobactèries similar ja que en els tres casos a dia 9 hi havia més de 3×10^4 UFC/g de mostra (veure taula 03). En el cas de B i BPL37 es partia del mateix valor d'enterobactèries a dia 0 i en el cas de BPL34 els valors dels dies 0 i 2 van ser incongruents ja que van ser molt inferiors a totes les altres mostres analitzades.

Quant a la mostra patró, també va presentar un augment de colònies d'enterobactèries del dia 0 al 9, tot i que aquest increment es va quedar una unitat logarítmica per sota de les mostres B, BPL34 i BPL37.

Finalment, la mostra inoculada amb BPL22 va ser la que va presentar més quantitat d'enterobactèries ja que a dia 0 ja tenia recomptes dues unitats logarítmiques més que les mostres B, P, BPL37 i BPL49. El mateix va passar a dia 9 que, mentre les altres mostres presentaven recomptes entre 10^3 i 10^4 UFC/g, la que contenia BPL22 tenia valors de 10^7 UFC/g.

Per tant, quant al control del creixement d'enterobactèries no trobem que hi hagi cap BAL de les avaluades que s'assembli a la mostra patró.

4.2.3. Resultats del recompte de coliforms totals i fecals

Abans de tot cal dir que aquests recomptes es va fer pel mètode del Nombre Més Probable (NMP) en tres tubs. Aquest mètode té la limitació que el valor màxim que pot detectar és $>2.4 \times 10^3$ NMP/g. Això vol dir que les mostres que van presentar valors superiors a 10^3 UFC/g van obtenir el mateix NMP/g.

Com es pot observar a la taula 04 els resultats de coliforms totals no són fiables degut que les mostres B i P van presentar incongruències de resultats que fan que no els puguem comparar amb la resta. A més, també es veu com a dia 9 tots els tractaments excepte el B i BPL49 van presentar el valor màxim que el mètode permetia.

En el cas del B, els valors que es van obtenir no són fiables ja que no té sentit que en dos dies la quantitat de coliforms totals disminuís de $>2.4 \times 10^3$ NMP/g a 21 NMP/g, es mantingués a 150 NMP/g a dia 7 i augmentés fins a 2.1×10^2 el dia 9. En el cas de BPL49 no es disposen de dades a dia 9, tot i que ja presentava els valors màxims que el mètode permetia des de la primera determinació.

Causes d'aquestes incongruències poden venir donades per la manera de fer les lectures o les inoculacions ja que per impossibilitat d'horaris es van haver de fer entre varies persones. També pot ser que hi hagués hagut algun problema amb l'estufa que dificultés el creixement dels microorganismes.

Per tant, encara que els resultats no són fiables es pot dir que no hi ha diferències entre tractaments quant a coliforms totals.

Degut que els recomptes de coliforms fecals es van fer a partir de les mostres de coliforms totals, els resultats obtinguts tampoc són fiables.

La mostra B és qui presenta menys quantitat de coliforms fecals a dia 0 i la mostra P, qui més (taula 05). Aquest resultat pot venir per una contaminació de la mostra a l'hora de pesar-la o pels errors acumulats en els passos anteriors (inoculació, cultiu, lectura, etc.).

Tot i això observem que, en general, hi ha una disminució de coliforms fecals del dia 0 al 9.

Vázquez *et al.*, 2009 també va fer detecció de coliforms totals i fecals en carn de vedella i van obtenir uns recomptes inicials de coliforms totals de 2.38 log NMP/g, és a dir uns valors similars als nostres que es troben entre 2 i 3 log NMP/g. En canvi, obtenen valors inicials de coliforms fecals inferiors als nostres, 0.95 log NMP/G mentre que els nostres varien entre 1 i 3 log NMP/g. Com a resultat final observen que la carn tractada amb BC té uns recomptes finals (a 12 dies) significativament inferiors a la mostra control mentre que en el nostre cas no s'observen diferències entre tractaments.

4.2.4. Resultats de la detecció d'*E. coli*

En aquest cas, no es va fer recompte d'*E. coli* si no que es va mirar si hi havia presència en les mostres analitzades. En cas de presència, el medi de la zona de creixement d'*E. coli* virava a un color verd metal·litzat amb colònies de color negre brillant. També va succeir que aquest color verd metal·litzat no era gaire evident o només es presentava en algunes zones; en aquest cas dèiem que hi havia presència lleu.

Segons es pot veure a la taula 06, es va trobar que en totes les determinacions –és a dir des del dia 0 al 9-, les mostres B i les inoculades amb BPL34, BPL37 i BPL49 van mostrar presència d'*E. coli*. Quant a la mostra P, a dia 0 va haver-hi presència d'*E. coli*; els dies 2 i 9 hi havia presència lleu i a dia 7 hi va haver absència. Finalment, en les mostres inoculades amb BPL22 a dia 0 i 7 hi va haver presència lleu, mentre que a dies 2 i 9 hi va haver absència.

D'aquests resultats es pot concloure que la mostra que més s'acosta a la mostra patró en quant a control del creixement d'*E. coli* és la que va ser inoculada amb BPL22 (*Lactobacillus pentosus*).

4.2.5. Resultats de la detecció de *Salmonella* spp.

En aquest últim cas, cap de les mostres avaluades ha presentat presència de *Salmonella* spp.

4.3.Efectes de les bacteries bioconservants contra patògens

Dels resultats anteriors es va concloure que, tot i que no hi havia massa diferències entre les mostres analitzades, el microorganisme que semblava que podia tenir cert efecte contra *E. coli* era BPL22. És per això que es va decidir provar si aquest microorganisme, a més de tenir efecte contra *E. coli*, també podria tenir efecte contra, *Listeria* i *Salmonella*.

Quant a l'efecte contra *E. coli*, a la taula 07 es pot observar que tant per la mostra B, com la P com la BPL22, la quantitat d'*E. coli* va augmentar a mesura que van passant els dies. Tot i que l'augment a dia 9 és menor en BPL22 comparat amb els altres dos tractaments, no podem dir que hi hagi diferències entre ells. No obstant, veient que el creixement d'*E. coli* és menor en BPL22, s'haurien de fer més proves per poder descartar-lo com a productori de BC contra *E. coli*, com ara proves en medis de cultiu o provar en altres aliments.

Respecte a les hamburgueses inoculades amb *L. innocua*, a la taula 08 es veu com, clarament, la quantitat de patògen va disminuir en el cas del P i va augmentar en el cas de B i BPL22.

Per tant, en aquest cas es pot afirmar que BPL22 no va tenir efecte bioconservant contra *Listeria* en la mostra avaluada. El cas contrari és el de l'estudi de Hartmann *et al.* (2011) on proven varis extractes de BAL contra *L. monocytogenes* i troben varies BC capaces de reduir la concentració de patògen. Aquestes BC les proven primer en brous de cultiu i després en carn picada i llet i observen que la concentració mínima efectiva per aconseguir 2.3 reduccions logarítmiques de *L. monocytogenes* era significativament superior quan s'aplicava en aliments que quan s'avaluava en brous de cultiu. Aquests resultats els expliquen per una distribució desigual o una baixa solubilitat en l'aliment, per inactivació de la BC degut a modificacions químiques o enzimàtiques produïdes en l'aliment o per adsorció de la BC als

components de l'aliment. Tots aquests factors s'han de tenir en compte a l'hora d'avaluar l'eficàcia d'una BC en un aliment.

Es troben altres estudis on apliquen BC amb resultats favorables contra *L. monocytogenes*, com el de Gálvez *et al.*, 2008 que cita varis articles que utilitzen Pediocina per reduir la població de *L. monocytogenes* en carn crua de vedella o el de Gao *et al.* (2015) que va estudiar l'efecte de *Lactobacillus sakei* C2 i la seva BC (sakacina C2) en pernil tallat i envasat al buit sobre *L. Monocytogenes*. Van trobar que si s'aplicaven les dos, l'efecte contra la població de *L. monocytogenes* era major que si s'aplicaven per separat i, a més, no es van trobar efectes negatius sobre l'olor o la proteòlisis derivats de l'addició de *Lb. Sakei*.

Finalment, pel que fa a les hamburgueses inoculades amb *Salmonella* spp., es va poder observar que la quantitat de patògen es mantenia al llarg del temps en els tres tractaments avaluats (taula 09).

Per tant, quant a l'avaluació de BPL22 enfront a microorganismes patògens, no podem dir que aquest microorganisme sigui eficaç com a bioconservant en les mostres avaluades tot i que caldria realitzar més proves per descartar-lo com a productor de BC contra *E. coli*.

4.4. Reflexions per a futurs estudis

Després d'observar els resultats obtinguts i les tenint en compte les limitacions trobades durant l'estudi es vol fer una autocrítica per poder millorar en cas de realitzar futurs estudis.

Primer de tot i, tenint en compte que l'estudi es realitzava en les instal·lacions de Paymsa on les tasques de l'estudi es van haver de compaginar amb les tasques pròpies del laboratori i les limitacions horàries, es creu que s'hauria d'haver limitat el nombre de BAL avaluades a una o dues per poder realitzar més rèpliques i obtenir així resultats més fiables.

Un altre punt a millorar seria el nombre de tractaments avaluats per prova. En aquest estudi sempre s'avalua una mostra B, una P i una o varies BAL sospitoses de produir BC. Es creu que podria haver estat interessant tenir una mostra control que contingués una BAL o una BC coneguda i amb efectes provats en matrius càrnies.

Hartmann *et al.* (2011) remarquen la importància d'avaluar molt minuciosament l'efectivitat de les BC en l'aliment on s'espera aplicar-les ja que en els seus resultats troben dues BC - sakacina A i sakacina X- que només són efectives disminuint *L. monocytogenes* en un tipus d'aliment cadascuna – en carn i en llet, respectivament- i tot i això, al cap d'un llarg temps d'emmagatzematge *L. monocytogenes* tornava a créixer. És per això que es creu que, en cas d'haver realitzat tot l'estudi a la UAB, es podrien haver fet proves prèvies en brous de cultiu per observar si les BAL eren productores de BC i contra quin patogen presentaven més eficàcia abans d'aplicar-les a un aliment. D'aquesta manera es podrien haver seleccionat millor les BAL productores de BC i també s'hauria avaluat si aquestes BAL eren efectives en una matriu càrnia, en el nostre cas les hamburgueses. Cal tenir en compte que els resultats de les proves amb BC variaran segons en quin aliment s'afegeixin ja que la seva eficiència depèn de la composició físico-química de l'aliment (Balciunas *et al.*, 2013).

Finalment, un altre punt a millorar és l'elecció dels microorganismes a avaluar. Tal i com indica Lücke (2000), les BAL mesòfiles, com les utilitzades en aquest estudi, no poden créixer bé en medis freds i es necessiten grans quantitats de BAL per poder veure efectes en la vida útil de carn crua refrigerada. També indica que hi ha BAL psicròtrofes que s'ha provat que poden controlar *L. monocytogenes* en carns que es troben a pH de 5,6-5,8. Per tant, en el cas de poder escollir les BAL a avaluar s'escolliran d'acord amb l'aliment on s'hagin d'incloure; les BAL mesòfiles van bé en productes fermentats o curats i les BAL psicròtrofes en aliments refrigerats. Relacionat amb aquest fet, es creu que en l'estudi s'hauria hagut d'avaluar el creixement de psicròfils, tal i com fan Vázquez *et al.* (2009) al seu estudi.

Com a reflexió final, tot i que es trobin BC efectives contra algun o més d'un patogen, s'està d'acord amb l'afirmació de Lücke (2000) que diu que l'ús de BC no compensa el fet d'haver utilitzat unes males pràctiques d'higiene i aquestes BC no han de destruir el creixement de microorganismes que ens avisarien d'un mal estat de l'aliment.

5. CONCLUSIONS

Degut a la limitació de resultats no es poden extreure conclusions fiables d'aquest estudi, ja que només es va poder realitzar una rèplica de cada prova i no es van observar diferències entre els valors del blanc i la mostra amb BC.

Tot i això, cal dir que, de les anàlisis de color i microbiològiques realitzades a les instal·lacions de Paymsa se'n desprèn que no hi ha diferències significatives entre les bacteries sospitoses de tenir acció bioconservant i les mostres blanc, sigui quina sigui la concentració de bioconservant aplicada. No obstant, s'observa que un dels microorganismes avaluats (BPL22) podria tenir cert efecte bioconservant contra *E. coli*.

A les instal·lacions de la UAB s'avalua aquest efecte en hamburgueses inoculades amb *E. coli* i també amb *L. innocua* i *Salmonella* spp. Sembla que el creixement d'*E. coli* és inferior en les hamburgueses inoculades amb BPL22 respecte el B i el P, però no s'observa cap diferència en les hamburgueses inoculades amb *L. innocua* i *Salmonella* spp.

6. BIBLIOGRAFIA

Anònim. 2005. Reglamento del 15 de noviembre de 2005. Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *DOCE*, L339: 1-26.

Anònim. 02 d'abril de 2015. World Health Day 2015: From farm to plate, make food safe. Disponible a: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/>

Ávila, I. 2011. Los sulfitos como conservantes y su control en los alimentos: ¿Beneficio o riesgo para la salud? Disponible a: <http://www.madridsalud.es/temas/aditivos.php>

Balciunas, E.M., Castillo, F.A., Dimitrov, S., Dora, B., Converti, A., Pinheiro, R. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32: 134-142.

Beristain-Bauza, S.C., Palou, E., López-Malo, A. 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de Ingenieria de Alimentos*, 6: 64-78.

Cleveland, J., Monville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M. 2001. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16: 1058-1071.

Fangio, M.F., Fritz, R. 2014. Potential use of a bacteriocin-like substance in meat and vegetable food biopreservation. *International Food Research Journal*, 21: 677-683.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 51-70.

Gálvez, A., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia E., Ben Omar, N. 2008. Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 125-152.

Gao, Y., Li, D., Liu, X. 2015. Effects of *Lactobacillus sakei* C2 and sakacin C2 individually or in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*, chemical and odor changes in vacuum-packed sliced cooked ham. *Food control*, 47: 27-31.

García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., Martínez, B. 2010. Food biopreservations: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Food Science & Technology*, 21: 373-382.

Grande, M^aJ., Lucas, R., López, M^aC., Pérez, R., Gálvez, A. 2011. Bioconservación de alimentos cárnicos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 120: 111-123.

Hartmann, H.A., Wilke, T., Erdmann, R. 2011. Efficacy of bacteriocin containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 146: 192-199.

Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49: 139-150.

Lücke, F.K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 55: 105-115.

Mora Peñaflor, N., García Guerrero, A. (2007) Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto.

Rai, M., Chikindas, M. 2011. *Natural antimicrobials in foodsafety and quality*. CABI, Wallingford. pp: 368.

Ramírez, J.C., Rosas, P., Velázquez, M.Y., Ulloa, J.A., Arce, F. 2011. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente*, Año 2, 7: 1-16.

Rodríguez, E., Arques, J., Núñez, M., Gaya, P., Medina, M. 2005. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. *Applied and environmental microbiology*, 71: 3399-3404.

Vázquez, S.M., Suárez, H., Montoya, O.I. 2009. Evaluación de bacteriocinas como medio protector para la biopreservación de la carne bajo refrigeración. *Revista Chilena de Nutrición*, 36: 228-238.

Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat. *Meat Science*, 86: 119-128.

7. ANNEXES

7.1. Figures

Figura 01. Medis de cultiu cromògens (Esquerra: medi per *E. coli* i *Salmonella* spp. Dreta: medi per *Listeria*)

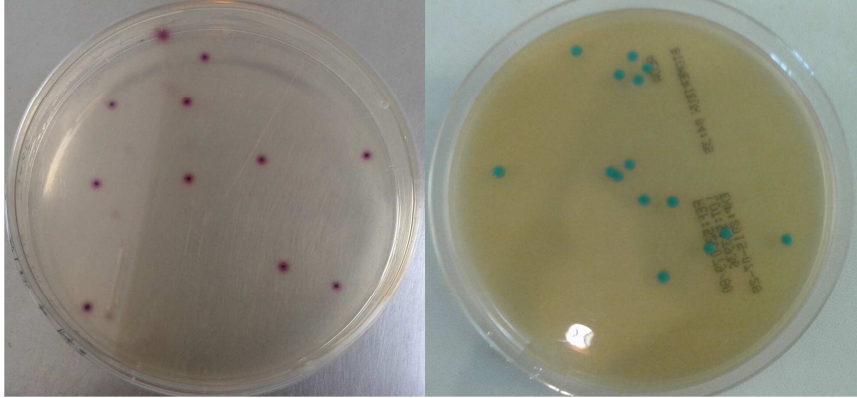


Figura 02. Color de les hamburgueses a dia 02. D'esquerra a dreta: B, P i amb BC.



Figura 03. Color de les hamburgueses a dia 09. D'esquerra a dreta: B, P i amb BC.



7.2. Taules

Taula 1. Color en hamburgueses B, P i inoculades amb BC

Tractament	L ₂	L ₄	a ₂	a ₄	b ₂	b ₄
Blanc	41,46	43,11	18,48	18,78	6,08	5,4
	42,59	43,52	17,83	18,32	5,77	5,39
	42,54	43,4	18,11	18,55	6,17	5,41
Patró	44,21	44,7	25,15	23,79	8,53	7,89
	44,55	44,42	24,76	24,16	8,27	8,06
	44,73	44,34	24,45	24,29	8,09	8,09
BPL7 -10 ⁹	42,84	43,08	19,6	22,6	6,82	7,26
	42,8	43	19,58	22,54	6,71	7,24
	42,82	42,95	19,57	22,52	6,78	7,23
BPL7 -10 ⁷	43,97	44,63	18,35	20,77	6,78	6,69
	43,94	44,43	18,3	20,67	6,73	6,66
	44,1	44,43	18,17	20,94	6,69	6,7
BPL7 -10 ⁵	44,83	45,25	17,48	18,61	6,73	5,96
	45,16	45,1	16,96	18,84	6,48	6,01
	45,18	45,03	17,67	18,86	6,55	5,99
BPL7 -10 ³	44,88	45,03	16,68	18,54	6,24	5,46
	44,74	44,95	16,67	18,64	6,12	5,42
	44,82	45,15	16,68	18,1	6,07	5,11
BPL9 -10 ⁹	44,37	44,35	18,68	19,47	6,89	6,57
	44,25	44,29	18,6	19,43	6,79	6,53
	44,22	44,19	18,61	19,5	6,78	6,53
BPL9 -10 ⁷	44,29	44,74	17,96	18,8	6,51	6,41
	44,39	44,57	17,83	18,87	6,35	5,38
	44,53	44,43	17,68	18,88	6,3	5,34
BPL9 -10 ⁵	44,1	44,48	18,06	18,92	6,95	5,79
	44,17	44,34	17,99	19	6,84	5,84
	44,2	44,37	17,95	19,02	6,78	5,87
BPL9 -10 ³	42,48	42,73	17,69	18,89	5,96	4,8
	42,66	42,62	17,55	19,12	5,99	4,83
	42,68	42,53	17,58	19,14	6	4,82
BPL49 -10 ⁹	42,15	42,68	18,99	20,42	6,25	5,58
	42,54	42,42	18,79	20,63	6,24	5,6
	42,56	42,39	18,35	20,57	5,83	5,59
BPL49 -10 ⁷	44,43	44,72	16,54	18,28	5,98	5,13
	44,86	44,61	16,49	18,31	6,02	5,1
	44,93	44,51	16,31	18,31	5,94	5,06
BPL49 -10 ⁵	44,39	44,26	17,17	19,25	6,44	5,81
	44,77	44,26	17,08	19,27	6,6	5,82
	44,49	44,2	17,2	19,33	6,64	5,79
BPL49 -10 ³	43,39	43,49	17,09	18,61	6,03	4,99
	43,44	43,39	17	18,65	5,95	4,91
	43,42	43,37	16,99	18,52	5,96	4,81

Tractament	L ₂	L ₄	a ₂	a ₄	b ₂	b ₄
BPL24 -10 ⁹	44,1	43,98	18,79	19,67	6,97	6,29
	44,21	43,85	18,73	19,7	6,86	6,23
	44,16	43,81	18,61	19,76	6,79	6,3
BPL24 -10 ⁷	43,66	44,09	18,33	19,9	6,74	5,67
	43,95	43,97	18,09	19,21	6,64	5,85
	43,94	43,92	18	19,19	6,59	5,65
BPL24 -10 ⁵	44,46	44,97	17,58	17,82	6,38	5,47
	44,44	44,83	17,52	17,85	6,31	5,44
	44,45	44,8	17,5	17,8	6,32	5,43
BPL24 -10 ³	42,86	42,94	18,79	19,62	6,34	5,42
	42,89	42,8	18,33	19,57	6,02	5,36
	42,92	42,76	18,56	19,54	6,32	5,36
BPL37 -10 ⁹	41,96	41,9	19,22	19,78	6,42	5,31
	42,11	41,72	19,6	19,94	6,35	5,31
	42,26	41,72	19,09	19,88	6,3	5,29
BPL37 -10 ⁷	44,57	44,75	17,05	17,74	6,47	5,41
	44,91	44,82	16,78	17,77	6,42	5,42
	44,45	44,74	16,94	17,79	6,25	5,41
BPL37 -10 ⁵	44,12	44,26	17,41	18,47	6,46	5,16
	44,08	44,07	17,21	18,45	6,33	5,15
	44,26	44,24	17,09	18,15	6,2	5,02
BPL37 -10 ³	44,68	44,95	16,94	17,75	6,27	5,14
	44,69	44,8	16,82	17,79	6,13	5,12
	44,7	44,76	16,75	17,74	6,09	5,08
BPL22 -10 ⁹	44,52	45,1	17,43	17,45	6,75	6,18
	44,6	45,22	17,26	17,34	6,69	6,1
	44,65	45,29	17,25	17,21	6,67	6,08
BPL22 -10 ⁷	44,9	45,09	16,87	18,47	6,39	5,45
	45,04	45,14	16,9	18,33	6,54	5,35
	45,25	45,19	16,73	18,32	6,48	5,39
BPL22 -10 ⁵	43,28	43,27	17,27	18,52	6,13	5,14
	43,1	43,13	17,31	18,57	6,07	5,12
	43,13	43,1	17,32	18,64	6,09	5,1
BPL22 -10 ³	43,78	44,13	17,36	18,71	6,78	5,49
	43,76	44,03	17,22	18,73	6,59	5,45
	43,93	44,14	17,2	18,6	6,63	5,42
BPL34 -10 ⁹	42,28	42,63	18,55	21,52	6,12	6,18
	42,34	42,6	18,35	21,45	6,02	6,12
	42,46	42,69	18,33	21,32	5,95	6,02
BPL34 -10 ⁷	42,66	53,06	17,27	19,53	5,76	5,22
	42,51	42,92	17,25	19,53	5,66	5,21
	42,55	43,03	17,27	19,43	5,64	5,18
BPL34 -10 ⁵	45,18	44,94	16,2	18,87	6,39	5,79
	45,15	45,11	16,15	18,75	6,31	5,75
	45,33	45,17	15,99	18,85	6,31	5,74
BPL34 -10 ³	43,75	43,66	16,67	18,95	6,01	5,47
	43,68	43,8	16,69	18,9	6,01	5,48
	43,67	43,89	16,71	18,9	6,01	5,5

Tractament	L ₂	L ₄	a ₂	a ₄	b ₂	b ₄
BPL08 -10 ⁹	46,32	46,03	17,72	18,47	7,44	7,06
	45,97	46,18	17,78	18,29	7,26	6,96
	46,11	46,03	18,03	18,19	7,61	6,89
BPL08 -10 ⁷	43,84	43,63	17,07	19,12	6,14	5,63
	43,89	43,7	16,97	19	6,02	5,6
	43,97	43,83	16,94	18,95	6,02	5,58
BPL08 -10 ⁵	43,95	44,37	17,23	17,66	6,27	5,62
	43,93	44,31	17,33	17,86	6,28	5,62
	44,11	44,35	17,1	17,77	6,15	5,56
BPL08 -10 ³	44,62	44,52	16,89	18,17	6	5,36
	44,49	44,43	16,91	18,04	5,96	5,41
	44,43	44,6	16,5	18,02	5,73	5,34

L₂, a₂ i b₂: valoracions de color a dia 2. L₄, a₄ i b₄: valoracions de color a dia 4.

Taula 02. Recompte d'aerobis mesòfils (UFC/g) per dia i tractament.

	0	2	7	9
<i>Blanc</i>	10 ⁵	4×10 ⁵	2.32×10 ⁸	>3 ×10 ⁸
<i>Patró</i>	2.3×10 ⁵	9×10 ⁴	3.44 ×10 ⁷	>3 ×10 ⁸
<i>BPL34</i>	2.6×10 ⁶	1.34×10 ⁶	>1.2 ×10 ⁹	4.64 ×10 ⁹
<i>BPL37</i>	4.12×10 ⁷	1.9 ×10 ⁶	>1.2 ×10 ⁹	2.29 ×10 ¹⁰
<i>BPL49</i>	8×10 ⁵	6.1×10 ⁶	2.04 ×10 ⁹	^a
<i>BPL22</i>	5.1×10 ⁷	1×10 ⁸	2.13 ×10 ¹⁰	>3 ×10 ¹¹

^a No hi ha resultats disponibles

Taula 03. Recompte d'enterobactèries (UFC/g) per dia i tractament.

	0	2	7	9
<i>Blanc</i>	3.5 × 10 ²	90	9 × 10 ²	>3× 10 ⁴
<i>Patró</i>	1.2 × 10 ²	4.3 × 10 ²	1.9 × 10 ³	9.6 × 10 ³
<i>BPL34</i>	20 ^a	30 ^a	1.6 × 10 ³	>3× 10 ⁴
<i>BPL37</i>	1.7 × 10 ²	3 × 10 ³	9 × 10 ²	>3× 10 ⁴
<i>BPL49</i>	5.6 × 10 ³	2.02 × 10 ⁴	>3× 10 ⁵	^b
<i>BPL22</i>	1.09 × 10 ⁴	7.3 × 10 ⁴	>3× 10 ⁵	1.53 × 10 ⁷

^a Valors incongruents

^b No hi ha resultats disponibles

Taula 04. Nombre més probable (NMP/g) de coliforms totals per dia i tractament.

	0	2	7	9
<i>Blanc</i>	$>2.4 \times 10^3$	21 ^a	150 ^a	2.1×10^2
<i>Patró</i>	23 ^a	$>2.4 \times 10^3$	93 ^a	$>2.4 \times 10^3$
<i>BPL34</i>	4.8×10^2	1.1×10^3	$>2.4 \times 10^3$	$>2.4 \times 10^3$
<i>BPL37</i>	1.1×10^3	$>2.4 \times 10^3$	$>2.4 \times 10^3$	$>2.4 \times 10^3$
<i>BPL49</i>	$>2.4 \times 10^3$	$>2.4 \times 10^3$	$>2.4 \times 10^3$	^b
<i>BPL22</i>	$>2.4 \times 10^3$	$>2.4 \times 10^3$	$>2.4 \times 10^3$	$>2.4 \times 10^3$

^a Valors incongruents ^b No hi ha resultats disponibles

Taula 05. Nombre més probable (NMP/g) de coliforms fecals per dia i tractament.

	0	2	7	9
<i>Blanc</i>	23	43	<3	<3
<i>Patró</i>	$>2.4 \times 10^3$	4	<3	<3
<i>BPL34</i>	4.8×10^2	3 ^a	$>2.4 \times 10^3$	<3
<i>BPL37</i>	1.1×10^3	120	14	<3
<i>BPL49</i>	43	2.1×10^2	43	^b
<i>BPL22</i>	2.1×10^2	$>2.4 \times 10^3$	93	15

^a Valors incongruents ^b No hi ha resultats disponibles

Taula 06. Presència (S) o absència (N) d'*E. coli* en 25 g d'hamburguesa

	0	2	7	9
<i>Blanc</i>	S	S	S	S
<i>Patró</i>	S	Presència lleu	N	Presència lleu
<i>BPL34</i>	S	S	S	S
<i>BPL37</i>	S	S	S	S
<i>BPL49</i>	S	S	S	S
<i>BPL22</i>	presència lleu	N	Presència lleu	N

Taula 07. Recompte d'*E. coli* (UFC/g) en hamburgueses inoculades

	0	2	7	9
B	4×10^3	$2.6 - 4.6 \times 10^3$	$20 - 21 \times 10^5$	$0 - 1 \times 10^5$
P	$3 - 4 \times 10^3$	$8.6 - 10 \times 10^3$	$0 - 8 \times 10^5$	$1 - 2 \times 10^5$
BPL22	$6 - 7 \times 10^3$	$4 - 8.6 \times 10^3$	$0 - 11 \times 10^5$	$< 10^5$

Taula 08. Recompte de *L. innocua* (UFC/g) en hamburgueses inoculades

	0	2	7	9
B	$1 - 3 \times 10^4$	3×10^4	$15 - 23 \times 10^4$	$1.22 - 1.32 \times 10^6$
P	$1 - 2 \times 10^4$	$0 - 2 \times 10^4$	$< 10^4$	$< 10^4$
BPL22	$1 - 2 \times 10^4$	$0 - 1 \times 10^4$	$15 - 21 \times 10^4$	$5.1 - 5.4 \times 10^5$

Taula 09. Recompte de *Salmonella* spp. (UFC/g) en hamburgueses inoculades

	0	2	7	9
B	$1.2 - 1.8 \times 10^5$	2.3×10^5	$1 - 2 \times 10^5$	$2 - 4 \times 10^5$
P	$6 - 9 \times 10^4$	$1.9 - 2.1 \times 10^5$	$0 - 1 \times 10^5$	$0 - 2 \times 10^5$
BPL22	$1.2 - 1.5 \times 10^5$	$4.3 - 5.3 \times 10^5$	$0 - 2 \times 10^5$	1×10^5